

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

13.09.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年    9 月    8 日  
Date of Application:

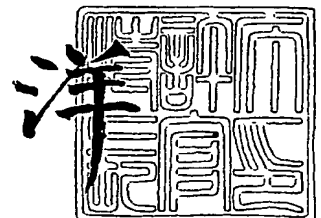
出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 3 1 6 0 8 1  
Application Number:  
[ST. 10/C] :                      [ J P 2 0 0 3 - 3 1 6 0 8 1 ]

出      願      人                      株式会社セルフリーサイエンス  
Applicant(s):

2 0 0 5 年    2 月 1 7 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 3-1146  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/09  
【発明者】  
    【住所又は居所】 愛媛県松山市久万の台 4 7 8 - 1 7  
    【氏名】 遠藤 弥重太  
【発明者】  
    【住所又は居所】 愛媛県松山市本町 3 - 1 - 8 - 7 0 1  
    【氏名】 澤崎 達也  
【特許出願人】  
    【識別番号】 594016182  
    【氏名又は名称】 遠藤 弥重太  
【特許出願人】  
    【識別番号】 503056643  
    【氏名又は名称】 澤崎 達也  
【代理人】  
    【識別番号】 100088904  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 庄司 隆  
    【電話番号】 03-3864-6572  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100124453  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 資延 由利子  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 067070  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【物件名】 包括委任状 1  
    【援用の表示】 包括委任状番号 0 0 1 7 3 9 3

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

以下の工程の少なくとも 3) ~ 5) を含むコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成手段を使用する生理活性タンパク質に対する薬剤探索方法。

- 1) 生理活性タンパク質の遺伝子の塩基配列情報をもとにして、該生理活性タンパク質をコードする遺伝子を含有する遺伝子を合成する工程
- 2) 1) で合成した遺伝子から mRNA を合成する工程
- 3) 2) で合成された mRNA を鋳型として、コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系を用いて生理活性タンパク質を合成する工程
- 4) 候補薬剤をコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系に添加し、生理活性タンパク質に対する候補薬剤の反応性を確認する工程
- 5) 該反応性を指標として、当該生理活性タンパク質に対する薬剤をスクリーニングする工程

**【請求項 2】**

生理活性タンパク質に対する反応性の指標が、生理活性タンパク質の自己消化反応性を指標とすることを特徴とする請求項 1 の薬剤探索方法。

**【請求項 3】**

生理活性タンパク質に対する反応性の指標が、生理活性タンパク質の基質認識反応性を指標とすることを特徴とする請求項 1 の薬剤探索方法。

**【請求項 4】**

生理活性タンパク質に対する反応性の指標が、生理活性タンパク質のフォールディング過程での自己消化又はフォールディングの阻害若しくは停止又はミスフォールディングの誘発を指標とすることを特徴とする請求項 1 の薬剤探索方法。

**【請求項 5】**

生理活性タンパク質に対する候補薬剤の反応性が以下のいずれか 1 又は 2 以上から選ばれる請求項 1 の薬剤探索方法。

- 1) 転写過程の生理活性タンパク質の mRNA の合成を阻害又は停止する反応
- 2) 生理活性タンパク質の 1 若しくは 2 以上の自己消化部位での自己消化を阻害及び／又は拮抗する反応
- 3) 生理活性タンパク質の 1 若しくは 2 以上の基質認識部位での基質認識を阻害及び／又は拮抗する反応
- 4) 翻訳過程の生理活性タンパク質の合成を阻害又は停止する反応
- 5) フォールディング過程の生理活性タンパク質の自己消化又はフォールディングを阻害若しくは停止する反応又はミスフォールディングを誘発する反応

**【請求項 6】**

請求項 1 の 3) ~ 5) 又は 2) ~ 5) の工程を、一つの反応系で行うことを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 に記載の薬剤探索方法。

**【請求項 7】**

コムギ胚芽抽出液が、胚乳及び低分子物質が実質的に除去されたコムギ胚芽抽出物による無細胞タンパク質合成手段である請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 に記載の薬剤探索方法。

**【請求項 8】**

生理活性タンパク質が、病原体の増殖に関与するタンパク質であることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 に記載の薬剤探索方法。

**【請求項 9】**

生理活性タンパク質が、プロテアーゼであることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 に記載の薬剤探索方法。

**【請求項 10】**

生理活性タンパク質の遺伝子が以下のいずれか 1 から由来する遺伝子である請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 に記載の薬剤探索方法。

- 1) 二本鎖 DNA ウイルス、2) 1 本鎖 DNA ウイルス、3) プラス鎖 RNA ウイルス、4) マイ

ナス鎖RNAウイルス、5) 二本鎖RNAウイルス、6) レトロウイルス、7) ヘパドナウイルス

【請求項 11】

生理活性タンパク質が以下のいずれか1である請求項1～10のいずれか1に記載の薬剤探索方法。

1) RNA polymerase、2) DNA polymerase、3) helicase、4) コートタンパク質、5) キャプシドタンパク質

【請求項 12】

生理活性タンパク質の遺伝子がSARSに由来する請求項1～11のいずれか1に記載の薬剤探索方法。

【請求項 13】

請求項1～12のいずれか1に記載の薬剤探索方法で得られる薬剤。

【請求項 14】

請求項1～12のいずれか1に記載の薬剤探索方法に使用される試薬キット。

【請求項 15】

SARS 3CL<sup>pro</sup>タンパク質をコードするDNAを増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 16】

配列番号6～21に記載のいずれか1のヌクレオチドを含む請求項15に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 17】

請求項15又は16に記載のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて合成される、SARS 3CL<sup>pro</sup>タンパク質をコードするDNA。

【請求項 18】

請求項17に記載のSARS 3CL<sup>pro</sup>タンパク質をコードする配列番号1に記載のDNA。

【請求項 19】

請求項17又は18に記載のDNAを用いて、コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞系で合成されたSARS 3CL<sup>pro</sup>タンパク質。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】生理活性タンパク質に対する薬剤の新規ハイスループットスクリーニング法

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明はコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系を利用する、生理活性タンパク質に対する薬剤特に阻害剤を、安全にそして迅速に探し出す方法に関する。具体的には、ウイルスを含む病原体の塩基配列情報をもとに、組換え実験の規制にもとづくバイオハザード等の制約を受けることなく、試験管内で安全、簡便かつ効率的並びに遺伝子からタンパク質を同一反応系で合成させる。さらに、co-translationalに生理活性タンパク質の活性を追うことが可能な無細胞タンパク質合成系を利用することにより、細胞内の環境により近い反応系において、該生理活性タンパク質の自己消化、基質認識、翻訳又はフォールディング過程の機能、構造等についての反応性を指標とした薬剤特に阻害剤をスクリーニングする方法に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

細胞内におけるタンパク質合成を試験管等の生体外で行う方法としては、例えばリボソームやその他のタンパク質合成に必要な成分を生物体から抽出し（本明細書中では、これを「無細胞タンパク質合成用コムギ胚芽抽出物」と称することがある）、これらを用いた試験管内での無細胞タンパク質合成法の研究が盛んに行われている（特許文献1、特許文献2、特許文献3、特許文献4、特許文献5）。

## 【0003】

無細胞タンパク質合成系は、翻訳反応の正確性や速度において生細胞に匹敵する性能を保持し、かつ目的とするタンパク質を複雑な精製工程を実施することなく得ることができる有用な方法である。そのため該合成系をより産業上に適用するため、合成効率の上昇のみならず、合成用コムギ胚芽抽出物含有液やレディメイド型コムギ胚芽抽出物含有液を安定的に高品質を保持して提供することが必要である。

## 【0004】

一方、ウイルスを含む病原体により引き起こされる感染症は、化学療法の進歩などによりある程度克服できるようになったものの、毎年繰り返されるインフルエンザの流行、AIDSや大腸菌O157、SARS、西ナイルウイルス、エボラ出血熱のような新顔の感染症の登場、あるいは一時克服したと思われた結核の復活を見れば、依然として人類の大きな脅威である。こうした中で、最近、HIVウイルスに対するプロテアーゼ阻害剤が抗AIDS薬として有効であることが実証され、実用化された。ウイルスの増殖にとって不可欠であるプロテアーゼを標的とする感染症治療薬研究は今後、その重要性を増してゆくものと考えられる。

## 【0005】

現在、一般的に行われているプロテアーゼ阻害剤の研究は、遺伝子組換え技術により大腸菌などに生産させたプロテアーゼ蛋白質を、その基質となる蛋白質、被験物質と共存させ、基質を切断する活性を指標として阻害剤として有効な物質を探索するというものである。しかしながら、病原体由来蛋白質を遺伝子組換えにより生産する場合には、P3、P4の大掛かりな実験施設が必要であり、規制も数多い。さらに、十分な施設をもってしても、研究者がこれらの病原体に感染する危険性が皆無であるとはいえない。

## 【0006】

さらに従来法では、in vitroの実験においてプロテアーゼの阻害活性が確認された薬剤であっても、ウイルスの増殖を抑制できない場合がある。従来法で用いられているものは、フォールディングが完了した精製品であり、両者の構造の違いが、基質特異性に影響を与えることが考えられる。

## 【0007】

また最近問題となった感染症であるSARS（重症急性呼吸器症候群）は、2003年6月末日の時点で、世界中で8,447人の感染および811人が死に至った、2003年の初めに現われた新

興感染症である。

SARSは高熱、倦怠、悪寒、頭痛、及び呼吸困難によって特徴づけられ、進行すると肺間質症を引き起こし、挿管および機械的な呼吸を必要とする。現在、SARSに感染した人の致死率は約15%と高く、感染方法として、完全に他のルートを除外することができないが、主として直接接触により感染すると考えられている。多くの証拠から、SARS感染者から新型コロナウイルスが存在していることにより、SARSの原因の病原体が新型コロナウイルス (SARS-CoV) とされている。また、SARS-CoV自身の複製のために必須なタンパク質分解酵素 (proteinase) が知られており、該分解酵素はウイルスのライフサイクルでの重要な機能を示すだけでなく、SARSの症状を引き起こす原因となっていることも指摘されている (非特許文献2)。よって、SARS-CoVのproteinase (SARS 3CL<sup>pro</sup>) は、SARS治療の有効な薬剤ターゲットと考えられており、さまざまな研究が進められている。

#### 【0008】

これまでに、いくつかのグループによって、以下のようなSARSに対する薬剤研究が進められている。

SARS-CoVの主要proteinaseであるSARS 3CL<sup>pro</sup>の結晶構造による、三次元構造解析による、分子モデルリングによるSARS 3CL<sup>pro</sup>の候補阻害剤の検討 (非特許文献1)。

SARS 3CL<sup>pro</sup>とリガンドの結合メカニズムの分子モデルリングによる、SARSに対する薬剤候補の検討 (非特許文献2)。

これらは、いずれも実験的にSARS 3CL<sup>pro</sup>と阻害剤を検討したものではなく、阻害剤としての実用化には至っていない。

#### 【0009】

また、無細胞タンパク質合成系を用いて病原体に対する阻害剤の研究として、ウサギ網状赤血球由来無細胞タンパク質合成系でRhinovirus Proteasesを発現させて、自己消化を阻害する阻害剤のスクリーニング方法が提案されている。しかし、ウサギ網状赤血球由来無細胞タンパク質合成系を用いて、膨大な候補薬剤をスクリーニングするには、多量の合成液を確保する必要があること、コスト面でも課題があること、さらに当該合成系でのタンパク質発現量が微量であるために、スクリーニングの検出には放射性同位元素を用いたトレーサー実験を必要とするなど、実用的なスクリーニング方法とはいえなかった。(非特許文献3)。

#### 【0010】

以上のSARS研究の状況にかかわらず、現在、SARS治療に対する有効な薬剤は利用可能ではない。これは、SARSの病原体であるSARS-CoVが特定されてから、日が浅いこと。さらには、SARSの病原体のような致死率の高いウイルスを研究するための、バイオハザードの制約による実験の取り扱いの困難性。さらには、解読したゲノム配列をもとにして、発現した生理活性タンパク質が、立体構造、翻訳後修飾の問題により、生理活性タンパク質の活性を維持した状態でのスクリーニングが困難と考えられていたからである。

#### 【0011】

【特許文献1】特開平6-98790号公報

【特許文献2】特開平6-225783号公報

【特許文献3】特開平7-194号公報

【特許文献4】特開平9-291号公報

【特許文献5】特開平7-147992号公報

【特許文献6】国際特許出願PCT/US98/25742

【非特許文献1】Anand K, Ziebuhr J, Wadhwani P, Mesters JR, Hilgenfeld R. Coronavirus main proteinase (3CL<sup>pro</sup>) structure: basis for design of anti-SARS drugs. Science. 2003 Jun 13;300(5626):1763-7. Epub 2003 May 13.

【非特許文献2】Kuo-Chen Chou, Dong-Qing Wei, and Wei-Zhu Zhong Binding mechanism of coronavirus main proteinase with ligands and its implication to drug design against SARS. Biochemical and Biophysical Research Communications 308 (2003) 148-151

【非特許文献 3】 BEVERLY A. HEINZ, JOSEPH TANG, JEAN M. LABUS, FREDERICK W. CH ADWELL, STEPHEN W. KARLDOR, AND MARLYS HAMMOND Simple In Vitro Translation Assay To Analyze Inhibitors of Rhinovirus Proteases ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Jan. 1996, p. 267-270

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系を利用して、生理活性タンパク質に対する薬剤特に阻害剤の、安全にそして迅速なスクリーニング手段を提供することを課題とする。並びに従前にはない、co-translational に生理活性タンパク質の活性を追うことが可能なコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系の利用により、細胞内の環境により近い反応系において、生理活性タンパク質の自己消化、基質認識、翻訳又はフォールディング過程の機能、構造等についての反応性を指標とする生理活性タンパク質に対する薬剤特に阻害剤のスクリーニング手段を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、無細胞タンパク質合成手段のうちコムギ胚芽を利用した系で、活性を維持した生理活性タンパク質の合成系を構築し、その合成系を利用する代表例として SARS 3CL<sup>pro</sup> の阻害剤の候補物質のスクリーニング系を構築し本発明を完成した。

【0014】

つまり本発明はいかよりなる。

「1. 以下の工程の少なくとも 3) ~ 5) を含むコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成手段を使用する生理活性タンパク質に対する薬剤探索方法。

- 1) 生理活性タンパク質の遺伝子の塩基配列情報をもとにして、該生理活性タンパク質をコードする遺伝子を含有する遺伝子を合成する工程
- 2) 1) で合成した遺伝子から mRNA を合成する工程
- 3) 2) で合成された mRNA を鋳型として、コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系を用いて生理活性タンパク質を合成する工程
- 4) 候補薬剤をコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系に添加し、生理活性タンパク質に対する候補薬剤の反応性を確認する工程
- 5) 該反応性を指標として、当該生理活性タンパク質に対する薬剤をスクリーニングする工程

2. 生理活性タンパク質に対する反応性の指標が、生理活性タンパク質の自己消化反応性を指標とすることを特徴とする前項 1 の薬剤探索方法。

3. 生理活性タンパク質に対する反応性の指標が、生理活性タンパク質の基質認識反応性を指標とすることを特徴とする前項 1 の薬剤探索方法。

4. 生理活性タンパク質に対する反応性の指標が、生理活性タンパク質のフォールディング過程での自己消化又はフォールディングの阻害若しくは停止又はミスフォールディングの誘発を指標とすることを特徴とする前項 1 の薬剤探索方法。

5. 生理活性タンパク質に対する候補薬剤の反応性が以下のいずれか 1 又は 2 以上から選ばれる前項 1 の薬剤探索方法。

- 1) 転写過程の生理活性タンパク質の mRNA の合成を阻害又は停止する反応
- 2) 生理活性タンパク質の 1 若しくは 2 以上の自己消化部位での自己消化を阻害及び／又は拮抗する反応
- 3) 生理活性タンパク質の 1 若しくは 2 以上の基質認識部位での基質認識を阻害及び／又は拮抗する反応
- 4) 翻訳過程の生理活性タンパク質の合成を阻害又は停止する反応
- 5) フォールディング過程の生理活性タンパク質の自己消化又はフォールディングを阻害若しくは停止する反応又はミスフォールディングを誘発する反応

6. 前項1の3)～5)又は2)～5)の工程を、一つの反応系で行うことを特徴とする前項1～5のいずれか1に記載の薬剤探索方法。

7. コムギ胚芽抽出液が、胚乳及び低分子物質が実質的に除去されたコムギ胚芽抽出物による無細胞タンパク質合成手段である前項1～6のいずれか1に記載の薬剤探索方法。

8. 生理活性タンパク質が、病原体の増殖に關与するタンパク質であることを特徴とする前項1～7のいずれか1に記載の薬剤探索方法。

9. 生理活性タンパク質が、プロテアーゼであることを特徴とする前項1～8のいずれか1に記載の薬剤探索方法。

10. 生理活性タンパク質の遺伝子が以下のいずれか1から由来する遺伝子である前項1～9のいずれか1に記載の薬剤探索方法。

1) 二本鎖DNAウイルス、2) 1本鎖DNAウイルス、3) プラス鎖RNAウイルス、4) マイナス鎖RNAウイルス、5) 二本鎖RNAウイルス、6) レトロウイルス、7) ヘパドナウイルス

11. 生理活性タンパク質が以下のいずれか1である前項1～10のいずれか1に記載の薬剤探索方法。

1) RNA polymerase、2) DNA polymerase、3) helicase、4) コートタンパク質、5) キャプシドタンパク質

12. 生理活性タンパク質の遺伝子がSARSに由来する前項1～11のいずれか1に記載の薬剤探索方法。

13. 前項1～12のいずれか1に記載の薬剤探索方法で得られる薬剤。

14. 前項1～12のいずれか1に記載の薬剤探索方法に使用される試薬キット。

15. SARS 3CL<sup>Pro</sup>タンパク質をコードするDNAを増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマー。

16. 配列番号6～21に記載のいずれか1のヌクレオチドを含む前項15に記載のオリゴヌクレオチドプライマー。

17. 前項15又は16に記載のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて合成される、SARS 3CL<sup>Pro</sup>タンパク質をコードするDNA。

18. 前項17に記載のSARS 3CL<sup>Pro</sup>タンパク質をコードする配列番号1に記載のDNA。

19. 前項17又は18に記載のDNAを用いて、コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞系で合成されたSARS 3CL<sup>Pro</sup>タンパク質。」

#### 【発明の効果】

##### 【0015】

本発明は、コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系を利用することによって、生理活性タンパク質に対する薬剤特に阻害剤を安全、迅速にスクリーニングする手段を提供した。さらに本発明は、生理活性タンパク質の自己消化、基質認識、翻訳及び／又はフォールディング過程における機能若しくは構造等についての反応性を指標とする生理活性物質タンパク質に対する薬剤特に阻害剤のスクリーニング手段を提供することに成功した。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0016】

#### (1) 無細胞タンパク質合成用コムギ胚芽抽出物含有液の調製

本発明に用いられる無細胞タンパク質合成系は、コムギ胚芽抽出物を用いるものである。ここで、無細胞タンパク質合成系とは、細胞内に備わるタンパク質翻訳装置であるリボソーム等を含む成分をコムギ胚芽から抽出し、この抽出液に転写、または翻訳鑄型、基質となる核酸、アミノ酸、エネルギー源、各種イオン、緩衝液、及びその他の有効因子を加えて試験管内で行う方法である。このうち、鑄型としてRNAを用いるもの（これを以下「無細胞翻訳系」と称することがある）と、DNAを用い、RNAポリメラーゼ等転写に必要な酵素をさらに添加して反応を行うもの（これを以下「無細胞転写／翻訳系」と称することがある）がある。本発明における無細胞タンパク質合成系は、上記の無細胞翻訳系、無細胞転写／翻訳系のいずれをも含む。



## 【0017】

本発明に用いられるコムギ胚芽抽出物含有液PROTEIOS™ (TOYOBO社製) として市販されている。

コムギ胚芽抽出液の調製法としては、コムギ胚芽の単離方法として、例えばJohnston, F. B. et al., Nature, 179, 160-161 (1957)に記載の方法等が用いられ、また単離した胚芽からのコムギ胚芽抽出物含有液の抽出方法としては、例えば、Erickson, A. H. et al., (1996) Meth. In Enzymol., 96, 38-50等に記載の方法を用いることができる。その他、特願2002-23139、特願2002-231340の方法が例示される。

## 【0018】

本発明で好適に利用されるコムギ胚芽抽出物は、原料細胞自身が含有する又は保持するタンパク質合成機能を抑制する物質(トリチン、チオニン、リボヌクレアーゼ等の、mRNA、tRNA、翻訳タンパク質因子やリボソーム等に作用してその機能を抑制する物質)を含む胚乳がほぼ完全に取り除かれ純化されている。ここで、胚乳がほぼ完全に取り除かれ純化されているとは、リボソームが実質的に脱アデニン化されない程度まで胚乳部分を取り除いた胚芽抽出物のことであり、また、リボソームが実質的に脱アデニン化されない程度とは、リボソームの脱アデニン化率が7%未満、好ましくは1%以下になっていることをいう。

## 【0019】

上記コムギ胚芽抽出物は、コムギ胚芽抽出物含有液由来および必要に応じて別途添加されるタンパク質を含有する。その含有量は、特に限定されないが、凍結乾燥状態での保存安定性、使い易さ等の点から、凍結乾燥前の組成物において、当該組成物全体の好ましくは1~10重量%、より好ましくは2.5~5重量%であり、また、凍結乾燥後の凍結乾燥組成物において、当該凍結乾燥組成物全体の好ましくは10~90重量%、より好ましくは25~70重量%である。なお、ここでいうタンパク質含有量は、吸光度(260, 280, 320 nm)を測定することにより算出されるものである。

## 【0020】

## (2) コムギ胚芽抽出物含有液からの潮解性物質の低減化

上記コムギ胚芽抽出物含有液は、抽出溶媒、あるいは抽出した後に行うゲルろ過に用いる緩衝液などが酢酸カリウム、酢酸マグネシウムなどの潮解性物質を含んでいる。このため、該コムギ胚芽抽出物含有液を使い翻訳反応溶液を調製し、そのまま乾燥製剤とした場合、凍結乾燥工程において溶解等が起こり、その結果該製剤の品質の低下が見られるという問題がある。品質の低下とは、該製剤に水を添加した際、製剤が完全に溶解せず、これを用いたタンパク質合成反応における合成活性も低下するものである。そこで、該コムギ胚芽抽出物含有液に含まれる潮解性物質の濃度を、凍結乾燥した後に製剤の品質に影響を及ぼさない程度に低減する。潮解性物質の具体的な低減方法としては、例えば、予め潮解性物質を低減、または含まない溶液で平衡化しておいたゲル担体を用いたゲルろ過法、あるいは透析法等が挙げられる。このような方法により最終的に調製される翻訳反応溶液中の潮解性物質の終濃度として60 mM以下となるまで低減する。具体的には、最終的に調製される翻訳反応溶液中に含まれる酢酸カリウムの濃度を60 mM以下、好ましくは50 mM以下に低減する。そして、さらに凍結乾燥処理された製剤における、潮解性を示す物質(潮解性物質)は、凍結乾燥状態での保存安定性を低下させない含有量は、当該凍結乾燥製剤中に含有されるタンパク質1重量部に対して、0.01重量部以下が好ましく、特に0.005重量部以下が好ましい。

## 【0021】

## (3) 夾雑微生物の除去

コムギ胚芽抽出物含有液には、微生物、特に糸状菌(カビ)などの胞子が混入していることがあり、これら微生物を除去しておくことが好ましい。特に長期(1日以上)の無細胞タンパク質合成反応中に微生物の繁殖が見られることがあるので、これを阻止することは重要である。微生物の除去手段は特に限定されないが、ろ過滅菌フィルターを用いるのが好ましい。フィルターのポアサイズとしては、混入する可能性のある微生物が除去可能

なサイズであれば特に限定されないが、通常 0.1～1 マイクロメートル、好ましくは 0.2～0.5 マイクロメートルが適当である。

#### 【0022】

##### (4) コムギ胚芽抽出物含有液から低分子合成阻害物質の除去方法

以上のような操作に加えて、コムギ胚芽抽出物含有液の調製工程の何れかの段階において低分子合成阻害物質の除去工程を加えることにより、より好ましい効果を有する生理活性タンパク質の無細胞タンパク質合成を行うためのコムギ胚芽抽出物含有液とすることができる。

胚乳成分が実質的に除去され調製されたコムギ胚芽抽出物含有液は、タンパク質合成阻害活性を有する低分子の合成阻害物質（以下、これを「低分子合成阻害物質」と称することがある）を含んでおり、これらを取り除くことにより、タンパク質合成活性の高いコムギ胚芽抽出物含有液を取得することができる。具体的には、コムギ胚芽抽出物含有液の構成成分から、低分子合成阻害物質を分子量の違いにより分画除去する。低分子合成阻害物質は、コムギ胚芽抽出物含有液中に含まれるタンパク質合成に必要な因子のうち最も小さいもの以下の分子量を有する分子として分画することができる。具体的には、分子量 50,000～14,000 以下、好ましくは 14,000 以下のものとして分画、除去し得る。低分子合成阻害物質のコムギ胚芽抽出物含有液からの除去方法としては、それ自体既知の通常用いられる方法が用いられるが、具体的には、透析膜を介した透析による方法、ゲルろ過法、あるいは限外ろ過法等が挙げられる。このうち、透析による方法が、透析内液に対しての物質の供給のし易さ等の点において好ましい。

#### 【0023】

透析による低分子合成阻害物質の除去操作に用いる透析膜としては、50,000～12,000 の除去分子量を有するものが挙げられる、具体的には除去分子量 12,000～14,000 の再生セルロース膜（Viskase Sales, Chicago 製）や、除去分子量 50,000 のスペクトラ／ポア 6（SPECTRUM LABORATORIES INC., CA, USA 製）等が好ましく用いられる。このような透析膜中に適当な量のコムギ胚芽抽出物含有液等を入れ常法を用いて透析を行う。透析を行う時間は、30 分～24 時間程度が好ましい。

#### 【0024】

低分子合成阻害物質の除去を行う際、コムギ胚芽抽出物含有液に不溶性成分が生成される場合には、この生成を阻害する（以下、これを「コムギ胚芽抽出物含有液の安定化」と称することがある）ことにより、最終的に得られるコムギ胚芽抽出物含有液あるいは翻訳反応溶液のタンパク質合成活性を高めることができる。コムギ胚芽抽出物含有液あるいは翻訳反応溶液の安定化の具体的な方法としては、上述した低分子合成阻害物質の除去を行う際に、コムギ胚芽抽出物含有液あるいは翻訳反応溶液を、少なくとも高エネルギーリン酸化合物、例えば ATP または GTP 等（以下、これを「安定化成分」と称することがある）を含む溶液として行う方法が挙げられる。高エネルギーリン酸化合物としては、ATP が好ましく用いられる。また、好ましくは、ATP と GTP、さらに好ましくは ATP、GTP、及び 20 種類のアミノ酸を含む溶液で行う。

#### 【0025】

これらの成分は、予め安定化成分を添加し、インキュベートした後、これを低分子阻害物質の除去工程に供してもよいし、低分子合成阻害物質の除去に透析法を用いる場合には、透析外液にも安定化成分を添加して透析を行って低分子合成阻害物質の除去を行うこともできる。透析外液にも安定化成分を添加しておけば、透析中に安定化成分が分解されても常に新しい安定化成分が供給されるのでより好ましい。このことは、ゲルろ過法や限外ろ過法を用いる場合にも適用でき、それぞれの担体を安定化成分を含むろ過用緩衝液により平衡化した後に、安定化成分を含むコムギ胚芽抽出物含有液あるいは翻訳反応溶液を供し、さらに上記緩衝液を添加しながらろ過を行うことにより同様の効果を得ることができる。

#### 【0026】

安定化成分の添加量、及び安定化処理時間としては、コムギ胚芽抽出物含有液の種類や

調製方法により適宜選択することができる。これらの選択の方法としては、試験的に量及び種類をふった安定化成分をコムギ胚芽抽出物含有液に添加し、適当な時間の後に低分子阻害物質の除去工程を行い、取得された処理後コムギ胚芽抽出物含有液を遠心分離等の方法で可溶化成分と不溶化成分に分離し、そのうちの不溶性成分が少ないものを選択する方法が挙げられる。さらには、取得された処理後コムギ胚芽抽出物含有液を用いて無細胞タンパク質合成を行い、タンパク質合成活性の高いものを選択する方法も好ましい。また、上述の選択方法において、コムギ胚芽抽出物含有液と透析法を用いる場合、適当な安定化成分を透析外液にも添加し、これらを用いて透析を適当時間行った後、得られたコムギ胚芽抽出物含有液中の不溶性分量や、得られたコムギ胚芽抽出物含有液のタンパク質合成活性等により選択する方法も挙げられる。

#### 【0027】

このようにして選択されたコムギ胚芽抽出物含有液の安定化条件の例として、具体的には、透析法により低分子合成阻害物質の除去工程を行う場合においては、そのコムギ胚芽抽出物含有液、及び透析外液中に、ATPとしては $100\mu\text{M}\sim 0.5\text{mM}$ 、GTPは $25\mu\text{M}\sim 1\text{mM}$ 、20種類のアミノ酸としてはそれぞれ $25\mu\text{M}\sim 5\text{mM}$ 添加して30分～1時間以上の透析を行う方法等が挙げられる。透析を行う場合の温度は、コムギ胚芽抽出物含有液のタンパク質合成活性が失われず、かつ透析が可能な温度であれば如何なるものであってもよい。具体的には、最低温度としては、溶液が凍結しない温度で、通常 $-10^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $-5^{\circ}\text{C}$ 、最高温度としては透析に用いられる溶液に悪影響を与えない温度の限界である $40^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $38^{\circ}\text{C}$ である。

#### 【0028】

また、低分子合成阻害物質の除去をコムギ胚芽抽出物含有液として調製した後に行えば、上記安定化成分をコムギ胚芽抽出物含有液にさらに添加する必要はない。

#### 【0029】

##### (5) コムギ胚芽抽出物含有液の還元剤濃度の低減方法

コムギ胚芽抽出物含有液に含まれる還元剤の濃度を低減させて無細胞タンパク質合成を行うことによれば、目的の生理活性タンパク質の分子内に存在するジスルフィド結合が形成された状態でタンパク質を取得することができる。コムギ胚芽抽出物含有液中の還元剤の低減方法としては、コムギ胚芽抽出物含有液を調製するに至る工程の何れかにおいて還元剤低減工程を行う方法が用いられる。還元剤は、最終的に調製されるコムギ胚芽抽出物含有液中の濃度として、該コムギ胚芽抽出物含有液を用いた翻訳反応において生理活性タンパク質が合成され得て、かつ分子内ジスルフィド結合が形成、保持され得る濃度に低減される。具体的な還元剤の濃度としては、ジチオスレイトール（以下、これを「DTT」と称することがある）の場合、コムギ胚芽抽出物含有液から調製された最終的な翻訳反応溶液中の終濃度が、 $20\sim 70\mu\text{M}$ 、好ましくは $30\sim 50\mu\text{M}$ に低減される。また、2-メルカプトエタノールの場合には、翻訳反応溶液中の最終濃度が、 $0.1\sim 0.2\text{mM}$ に低減される。さらに、グルタチオン／酸化型グルタチオンの場合には、翻訳反応溶液中の最終の濃度が $30\sim 50\mu\text{M}/1\sim 5\mu\text{M}$ となるように低減される。上述した具体的な還元剤の濃度は、これら限定されるものではなく、合成しようとするタンパク質、あるいは用いる無細胞タンパク質合成系の種類により適宜変更することができる。

#### 【0030】

還元剤の至適濃度範囲の選択法としては、特に制限はないが、例えば、ジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素の効果によって判断する方法を挙げることができる。具体的には、還元剤の濃度を様々にふったコムギ胚芽抽出物含有液由来翻訳反応溶液を調製し、これらにジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素を添加して分子内にジスルフィド結合を有する生理活性タンパク質の合成を行う。また、対照実験として同様の翻訳反応溶液にジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素を添加しないで同様のタンパク質合成を行う。ここで合成される生理活性タンパク質の可溶化成分を、例えば遠心分離等の方法により分離する。この可溶化成分が全体の50%（可溶化率50%）以上であり、またその可溶化成分がジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素の添加により増加した反応液が、該生理活

性タンパク質の分子内ジスルフィド結合を保持したまま合成する反応液として適している  
と判断することができる。さらには、上記のジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素の  
効果によって選択された還元剤の濃度範囲のうち、合成される生理活性タンパク質の最も  
多い還元剤の濃度をさらに好ましい濃度範囲として選択することができる。

#### 【0031】

具体的な還元剤の低減方法としては、還元剤を含まないコムギ胚芽抽出物含有液を調製  
し、これに無細胞タンパク質合成系に必要な成分とともに、上記の濃度範囲となるように  
還元剤を添加する方法や、コムギ胚芽抽出物含有液由来の翻訳反応溶液から上記の濃度範  
囲となるように還元剤を除去する方法等が用いられる。無細胞タンパク質合成用コムギ胚  
芽抽出物含有液はこれを抽出する際に高度の還元条件を必要とするため、抽出後にこの溶  
液から還元剤を取り除く方法がより簡便である。コムギ胚芽抽出物含有液から還元剤を取  
り除く方法としては、ゲルろ過用担体を用いる方法等が挙げられる。具体的には、例えば  
、セファデックス G-25 カラムを予め還元剤を含まない適当な緩衝液で平衡化してから  
、これにコムギ胚芽抽出物含有液を通す方法等が挙げられる。

#### 【0032】

##### (6) 翻訳反応溶液の調製

以上のように調製されたコムギ胚芽抽出物含有液は、これにタンパク質合成に必要な核  
酸分解酵素阻害剤、各種イオン、基質、エネルギー源等（以下、これらを「翻訳反応溶液  
添加物」と称することがある）および翻訳鋳型となる目的の生理活性タンパク質をコード  
する mRNA 及び所望によりイノシトール、トレハロース、マンニトールおよびスクロ  
ース-エピクロロヒドリン共重合体からなる群から選択される成分を含有する安定化剤を添  
加して翻訳反応溶液を調製する。各成分の添加濃度は、自体公知の配合比で達成可能であ  
る。

#### 【0033】

翻訳反応溶液添加物として、具体的には、基質となるアミノ酸、エネルギー源、各種イ  
オン、緩衝液、ATP 再生系、核酸分解酵素阻害剤、tRNA、還元剤、ポリエチレング  
リコール、3', 5'-cAMP、葉酸塩、抗菌剤等が挙げられる。また、それぞれ濃度は  
、ATP としては  $100\ \mu\text{M} \sim 0.5\ \text{mM}$ 、GTP は  $25\ \mu\text{M} \sim 1\ \text{mM}$ 、20 種類のアミ  
ノ酸としてはそれぞれ  $25\ \mu\text{M} \sim 5\ \text{mM}$  含まれるように添加することが好ましい。これら  
は、翻訳反応系に応じて適宜選択して組み合わせる用いることができる。具体的には、コ  
ムギ胚芽抽出物含有液としてコムギ胚芽抽出液を用いた場合には、 $20\ \text{mM}$  HEPES-KOH (pH  
7.6)、 $100\ \text{mM}$  酢酸カリウム、 $2.65\ \text{mM}$  酢酸マグネシウム、 $0.380\ \text{mM}$  スペ  
ルミジン（ナカラ・テスク社製）、各  $0.3\ \text{mM}$  L 型アミノ酸 20 種類、 $4\ \text{mM}$  ジチ  
オスレイトール、 $1.2\ \text{mM}$  ATP（和光純薬社製）、 $0.25\ \text{mM}$  GTP（和光純  
薬社製）、 $16\ \text{mM}$  クレアチンリン酸（和光純薬社製）、 $1000\ \text{U/ml}$  Rnase inhi  
biter（TAKARA 社製）、 $400\ \mu\text{g/ml}$  クレアチンキナーゼ（Roche 社製）を加え、  
十分溶解した後に、目的の生理活性タンパク質をコードする mRNA を担持する翻訳鋳型 mRNA  
を入れたもの等が例示される。

#### 【0034】

ここで、目的の生理活性タンパク質をコードする mRNA は、コムギ胚芽からなる無細胞タ  
ンパク質合成系において合成され得る生理活性タンパク質をコードするものが、適当な RN  
A ポリメラーゼが認識する配列と、さらに翻訳を活性化する機能を有する配列の下流に連  
結された構造を有している。RNA ポリメラーゼが認識する配列とは、T3 または T7 RNA ポリメ  
ラーゼプロモーター等が挙げられる。また、無細胞タンパク質合成系において翻訳活性を  
高める配列として  $\Omega$  配列又は Sp6 等をコーディング配列の 5' 上流側に連結させた構造を有  
するものが好ましく用いられる。

#### 【0035】

##### (7) 生理活性タンパク質

本発明に係る生理活性タンパク質とは、生物の遺伝子の塩基配列をもとに、合成させた  
生物由来の特有の機能を有するタンパク質のことを言う。また、生理活性タンパク質を構

成する塩基配列は、必ずしも生物の塩基配列と同一である必要はなく、特有の機能を有するタンパク質であれば、塩基配列に、適宜、欠失、置換、付加、挿入などの変異を導入した塩基配列であってもよい。具体例としては、ウイルスを含む病原体の遺伝子の塩基配列をもとにして、合成させた該病原体由来の特有の機能を有するタンパク質である。ウイルスを含む病原体の種類としては、二本鎖DNAウイルス、一本鎖DNAウイルス、プラス鎖RNAウイルス、マイナス鎖RNAウイルス、二本鎖RNAウイルス、レトロウイルス、ヘパドナウイルス等が挙げられるが限定はされない。また、生理活性タンパク質の特有の機能としては、病原体の増殖に関与するタンパク質、詳しくはプロテアーゼ、ヘリカーゼ、RNAポリメラーゼ等並びにウイルスの構造形成に関与するコートタンパク質、キャプシドタンパク質が挙げられるが限定はされない。

#### 【0036】

本発明にあっては、生理活性タンパク質をコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞合成系で転写／翻訳すれば、立体構造をネイティブに近い状態でかつ活性を維持した生理活性タンパク質を容易に合成でき、さらに該合成系での反応と同時に候補薬剤を添加することによって、容易に自己消化、基質認識、翻訳又はフォールディング過程の反応をターゲットとした有用な候補薬剤をスクリーニング可能である。

実施例では、すでに公開されているSARS-CoVの主要タンパク質分解酵素であるSARS 3CL<sup>pro</sup>のアミノ酸配列（GenBANKのアクセッションナンバーAY274119）をもとに合成した。すなわち、アミノ酸配列から各アミノ酸のコドンを検討し、プライマーのアニーリングサイトが短くなるように、GCリッチなコドンを選択してプライマーをデザインした。このプライマーを用いてInverse PCRにより全遺伝子を合成した。この遺伝子からmRNAを得て、このmRNAを鋳型として、コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞合成で翻訳してSARS 3CL<sup>pro</sup>を合成した。さらに、得られたSARS 3CL<sup>pro</sup>がプロテアーゼ活性を維持していることを示したことによりSARS 3CL<sup>pro</sup>を用いた薬剤スクリーニング系を構築したが、これは好適な例として開示したにすぎず、決して限定されるものではない。実施例で示されたSARS 3CL<sup>pro</sup>のアミノ酸配列は配列番号（32）に示されている。

#### 【0037】

##### （8）無細胞タンパク質合成用試薬を用いたタンパク質の合成方法

上記で調製された無細胞タンパク質合成用試薬は、前記で低減した潮解性物質および水をタンパク質合成反応に適した濃度になるように添加した溶解液で溶解し、それぞれ選択されたそれ自体既知のシステム、または装置に投入してタンパク質合成を行うことができる。タンパク質合成のためのシステムまたは装置としては、バッチ法（Pratt, J. M. et al., *Transcription and Translation*, Hames, 179-209, B. D. & Higgins, S. J., eds, IRL Press, Oxford (1984)）のように、本発明の無細胞タンパク質合成用試薬を溶解した翻訳反応溶液を適当な温度に保って行う方法や、無細胞タンパク質合成系に必要なアミノ酸、エネルギー源等を連続的に反応系に供給する連続式無細胞タンパク質合成システム（Spirin, A. S. et al., *Science*, 242, 1162-1164 (1988)）、透析法（木川等、第21回日本分子生物学会、WID6）、あるいは無細胞タンパク質合成系に必要なアミノ酸、エネルギー源等を含む溶液を翻訳反応溶液上に重層する方法（重層法：Sawasaki, T., et al., 514, 102-105 (2002)）等が挙げられる。

#### 【0038】

ここで、還元剤濃度を低減した無細胞タンパク質合成用試薬を用いた場合には、無細胞タンパク質合成系に必要なアミノ酸、エネルギー源等を供給する溶液についても同様の還元剤の濃度に調製する。さらに、翻訳反応をジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素の存在下で行えば、分子内のジスルフィド結合が保持された生理活性タンパク質を高効率で合成することができる。ジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素としては、例えばタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ等が挙げられる。これらの酵素の上記無細胞翻訳系への添加量は、酵素の種類によって適宜選択することができる。具体的には、コムギ胚芽から抽出した無細胞タンパク質合成用コムギ胚芽抽出物含有液であって、還元剤としてDTTを20～70、好ましくは30～50  $\mu$ M含有する翻訳反応溶液にタンパク質ジスルフィ

ドイソメラーゼを添加する場合、翻訳反応溶液としての最終濃度で0.01~10 $\mu$ Mの範囲、好ましくは0.5 $\mu$ Mとなるように添加する。また、添加の時期はジスルフィド結合が形成される効率から翻訳反応開始前に添加しておくことが好ましい。

#### 【0039】

##### (9) スクリーニング方法

本発明に係るコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞系でのスクリーニング方法は、従前にはない以下に示す1)~5)の工程の少なくとも3)~5)を含む候補薬剤のスクリーニング方法である。従前の候補薬剤のスクリーニング方法は、主に成熟したタンパク質の活性若しくは構造等を対象としたスクリーニング方法であったが、本発明のコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系により<1>、<3>~<5>のような状態の生理活性タンパク質に対する薬剤についてもスクリーニング対象とすることが可能となった。さらに、指標の対象を組み合わせることにより、薬理作用の機構が異なる薬剤や複合的な作用をもった薬剤をスクリーニングすることが可能となり、病原体に対してカクテル療法に適した薬剤のスクリーニングも可能である。

#### 【0040】

本発明に係るコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成手段を使用する生理活性タンパク質に対する薬剤探索方法は以下の1)~5)の工程を含む。

1) 生理活性タンパク質の遺伝子の塩基配列情報をもとにして、該生理活性タンパク質をコードする遺伝子を含有する遺伝子を合成する工程

生理活性タンパク質の遺伝子に、GFP, GUS, GST等の標識塩基配列、さらに生理活性タンパク質の認識配列を加えた生理活性タンパク質遺伝子の塩基配列とすることもできる。

2) 1)で合成した遺伝子からmRNAを合成する工程

転写過程は、従来既知の方法でも可能である。

3) 2)で合成されたmRNAを鋳型として、コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系を用いて生理活性タンパク質を合成する工程

無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液をピペットマン等及び/又は自動分注器のチャンネルピペッターにより複数の領域に区画された容器のそれぞれ異なるウェルに、該ウェルの容量に適した無細胞タンパク質合成用細胞抽出物含有液を添加する。続いて、タンパク質合成に必要な物質、翻訳鋳型及び安定化剤を含む溶液を各ウェルにピペットマン等及び/又は自動分注器のチャンネルピペッターにより必要量添加して、生理活性タンパク質を合成する。

4) 候補薬剤を無細胞タンパク質合成系に添加し、生理活性タンパク質に対する候補薬剤の反応性を確認する工程

候補薬剤の添加時期は、生理活性タンパク質合成系の転写工程、翻訳工程、自己消化過程、基質認識工程、フォールディング工程が起こるとされるいずれの時期でも良いが、従前にはない新しい系でのスクリーニング手段として、翻訳工程と同時に添加することにより、生理活性タンパク質のフォールディング工程もしくはフォールディングの変化等をターゲットとしたスクリーニングも可能となる。

5) 該反応性を指標として、当該生理活性タンパク質に対する薬剤をスクリーニングする工程

生理活性タンパク質に対する候補薬剤の反応性を質的又は量的に判定する方法としては、生理活性タンパク質についての反応性を検出できる方法であれば特に限定されない。具体的には、生理活性タンパク質の基質認識部位の標識化又は無細胞タンパク質合成系で合成される生理活性タンパク質に標識化を行い、該標識をマーカーにして、生理活性タンパク質に対する反応性を質的・量的に追跡してもよい。この場合の標識化手段としては、重水素、放射性同位元素、蛍光物質、色源体物質等一般的な手段が例示される。さらに、生理活性タンパク質の翻訳鋳型に対する反応性を指標とする候補薬剤については、無細胞タンパク質合成系で合成する生理活性タンパク質の発現量又は標識化した特定タンパク質の発現の有無から、生理活性タンパク質のmRNAに対する反応性についての質的・量的な判定もできる。

## 【0041】

以下に本発明での候補薬剤の生理活性タンパク質に対する反応性の指標の検出（判定）方法について説明するが、これらは代表的なものであって特には限定されない。

## &lt;1&gt;生理活性タンパク質のmRNAの翻訳反応

生理活性タンパク質のmRNAの翻訳過程において、候補薬剤を添加することによって、合成された生理活性タンパク質の量によって検出する。

生理活性タンパク質の塩基配列にマーカー配列を組み込むことによって、該マーカーの検出量によって検出する。さらには、SDS-PAGEを利用し、候補薬剤の存在の有無による合成された生理活性タンパク質のバンドの有無又は位置の変化を検出する。

## &lt;2&gt;成熟した生理活性タンパク質

プロテアーゼ：プロテアーゼの切断認識部位を含む標識化物質とプロテアーゼ及び候補薬剤を接触させ、標識化物質を検出する、またはSDS-PAGEし、プロテアーゼによって切断されたペプチドのバンドの有無及び位置を検出する。

RNAポリメラーゼ：DNAもしくはRNAを鋳型に、放射線もしくは蛍光ラベルされたリボヌクレオチド及び候補薬剤を反応させて新規RNAが合成されないことを、PAGEやキャピラリーで分離後、放射線ならオートラジオグラムで検出する、又は蛍光ならレーザーもしくは水銀ランプで励起し偏光フィルターで目的の波長を検出する。

DNAポリメラーゼ：DNAもしくはRNAを鋳型に、DNAもしくはRNAのプライマー、放射線もしくは蛍光ラベルされたデオキシリボヌクレオチド及び候補薬剤を反応させて新規DNAが合成されないことをPAGEやキャピラリーで分離後、放射線ならオートラジオグラムで検出する、又は蛍光ならレーザーもしくは水銀ランプで励起し偏光フィルターで目的の波長を検出する。

ヘリカーゼ：放射線もしくは蛍光ラベルされた2本鎖DNAもしくはRNAを鋳型に、一本鎖特異的核酸分解酵素及び候補薬剤を反応させて、鋳型が短くなったかどうかをPAGEやキャピラリーで分離後、放射線ならオートラジオグラムで検出する、又は蛍光ならレーザーもしくは水銀ランプで励起し偏光フィルターで目的の波長を検出する。

## &lt;3&gt;生理活性タンパク質の自己消化反応

生理活性タンパク質の自己切断認識部位を含む標識化物質と生理活性タンパク質及び候補薬剤を接触させ、標識化物質を検出する、又はSDS-PAGEし、プロテアーゼによって切断されたペプチドのバンドの有無及び位置を検出する。また、標識化物質と生理活性タンパク質間のリンカーに自己切断認識部位配列を含んだタンパク質を合成し、標識化物質を検出する。

## &lt;4&gt;生理活性タンパク質の基質認識反応

標識化物質を含む基質認識配列を含む物質、生理活性タンパク質、及び候補薬剤を接触させて蛍光強度の変化を検出する。またはSDS-PAGEし、基質認識した生理活性タンパク質のバンドの有無及び位置を検出する。

## &lt;5&gt;生理活性タンパク質のフォールディング反応

標識化した生理活性タンパク質が候補薬剤との反応により、フォールディングの停止又はミスフォールディングが誘発されたことを、NMRやCD等を使い、立体構造の変化を検出する。または、モノクローナル抗体や単鎖抗体との反応性でも確認することができる。

## 【0042】

本発明に係る候補薬剤は、自体公知のさまざまな化合物ライブラリーを選択することができる。コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系では、大腸菌等を用いた生細胞系でのスクリーニング系ではないので、細胞の増殖に影響の与える候補薬剤も使用可能である。

本発明に係る候補薬剤は、自体公知のさまざまな化合物ライブラリーを選択することができる。コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系では、大腸菌等を用いた生細胞系でのスクリーニング系ではないので、細胞の増殖に影響の与える候補薬剤や細胞に取り込まれにくい候補薬剤だけではなく、有機溶媒存在下でもタンパク質を合成できるため水に溶解しにくい候補薬剤も使用可能である。



## 【0043】

以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。

## 【実施例1】

## 【0044】

## SARS 3CL Proteaseの活性検出

## (1) SARS 3CL Protease遺伝子DNAのクローニング

SARS 3CLプロテアーゼ遺伝子のアミノ酸配列情報からデザインした合成DNAをプライマーとし、pBSIIKS+を鋳型として、InversePCRを行い、SARS 3CLプロテアーゼ遺伝子を作製した。すなわち、pBSIIKS+のHindIIIサイトをまたいで、センスプライマーS1（配列番号6）、アンチセンスプライマーA1（配列番号14）を用いて、InversePCRを行った後、エクソヌクレアーゼI処理により未反応のプライマーを除去した。得られたPCR産物を鋳型として、S1プライマー、A1プライマーの末端とそれぞれ15mer重なるS2プライマー（配列番号7）、A2プライマー（配列番号15）を用いてInversePCRを行った。この得られたPCR産物を鋳型として、S2プライマー、A2プライマーとそれぞれ15mer重なるS3プライマー（配列番号8）、A3プライマー（配列番号16）を用いてInverse PCRによってDNAを増幅した。続いて同様に15mer重なるようにデザインされたS3、A3、S4（配列番号9）、A4（配列番号17）、S5（配列番号10）、A5（配列番号18）、S6（配列番号11）、A6（配列番号19）、S7（配列番号12）、A7（配列番号20）、S8（配列番号13）、A8（配列番号21）を用いてInverse PCRを繰り返すことによってDNAを増幅した。このプラスミドをフェノール/クロロホルム抽出し、制限酵素であるHindIII（NEB社製）によって切断し、GENE CLEAN II Kit（フナコシ社製）によって精製を行った。この精製された制限酵素断片をセルフライゲーションによって環状化した。この環状化したプラスミドをTransformationした後アンピシリン（100 ppm）を含んだLB培地にプレーティングし、37℃で一晩培養した。PCR法により得られたコロニーから目的のDNA断片長をもつコロニーを選抜し、最終的に、シーケンスにより配列を確認した。目的のDNA断片をもつコロニーをSmall Scaleし、このプラスミドを大腸菌内で増幅した。この後プラスミドのみを得るためGenElute™ Plasmid Miniprep Kit（SIGMA社製）を用いて精製した。この得られたベクター（pBS-SA3CL<sup>Pro</sup>）を制限酵素であるXhoI、BamHI（NEB社製）で切断し、pEU-E01-MCSベクターを同様に、XhoI、BamHIで切断してGENE CLEAN II Kit（フナコシ社製）で精製した後、ライゲーションし同様にプラスミドを得た {pEU-E01-SA3CL<sup>Pro</sup>（配列番号1）}。このプラスミドをSPuプライマー（配列番号22）、AODA2303プライマー（配列番号23）を用いてPCRを行い、転写・翻訳用の鋳型を得た。

また、SARS 3CLプロテアーゼ活性の中心と推定されている145番目のシステインをアラニンに変換した変異体pEU-E01-SA3CL<sup>Pro</sup> (C145A)（配列番号3）も上記と同様な方法で構築した。

## 【0045】

## (2) 基質GFP-RS-GUS遺伝子DNAのクローニング

pEU-E01-GUSベクターをE01配列とXhoI配列を含んだアンチセンスプライマー（配列番号24）とPstI配列とGUSの開始コドンを含んだセンスプライマー（配列番号25）を用いてInverse PCRを行ったものと、pEU3-GFPベクターをXhoI配列とGFPの開始コドンを含んだセンスプライマー（配列番号26）とSA3CL<sup>Pro</sup>の切断部位の配列（RS）とGFPの一部の配列を含んだプライマー（配列番号27）を用いてPCRを行った。それぞれのPCR産物をフェノール/クロロホルム抽出し、XhoI、PstI（NEB社製）を用いてDNAを切断した。この切断されたDNAをGENE CLEAN II Kit（フナコシ社製）によって精製し、ライゲーションによってプラスミドを環状化し、Transformationし（1）と同様に目的のコロニーを選抜後Small Scaleし、このプラスミド {pEU-GFP-RS-GUS（配列番号2）} を大腸菌内で増幅した。

この後、プラスミドのみを得るためGenElute™ Plasmid Miniprep Kit（SIGMA社製）を用いて精製した。この得られたpEU-E01-GUSベクターをSPuプライマー、AODA2303プライマー



を用いてPCRを行った。

#### 【0046】

(3) GFP-RS-SA3CL<sup>Pro</sup> および GFP-RS-SA3CL<sup>Pro</sup> (C145A) 融合遺伝子のクローニング

pBS-SA3L<sup>Pro</sup> プラスミドを鋳型に PstI サイト、RS 配列の一部を含むセンスプライマーである RS-SA3L<sup>Pro</sup> -S1 (配列番号 28) と M13 プライマー (配列番号 29) を用いて PCR を行った。この PCR 産物をフェノール/クロロホルム抽出し、制限酵素である PstI (NEB 社製)、BamH 1 (NEB 社製) によって切断した。また、GFP-RS-GUS プラスミドを同様に PstI (NEB 社製)、BamH 1 (NEB 社製) によって切断した。この 2 種の切断された DNA を GENE CLEAN2 Kit (フナコシ社製) によって精製し、ライゲーションによってプラスミドを環状化し、Transformation し (1) と同様に目的のコロニーを選抜後、Small Scale し、このプラスミドを大腸菌内で増幅した。この後、プラスミド |pEU-GFP-RS-SA3CL<sup>Pro</sup> (配列番号 5)| のみを得るために GenElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit (SIGMA 社製) を用いて精製した。この得られた GFP-RS-SA3CL<sup>Pro</sup> ベクターを SPu プライマー、AODA2303 プライマーを用いて PCR を行った。

SARS 3CL プロテアーゼ活性の中心と推定されている 145 番目のシステインをアラニンに変換した変異体 SA3CL<sup>Pro</sup> (C145A) を組み込んだ、GFP-RS-SA3CL<sup>Pro</sup> (C145A) を構築した。

#### 【0047】

(4) GST-RS-SA3CL<sup>Pro</sup> 融合遺伝子のクローニング

pEU-E01-GSTN2 プラスミドを鋳型に XhoI サイトと GST の開始コドンを含んだセンスプライマー GST-RS-SA3L<sup>Pro</sup> sen (配列番号 30) と PstI サイトと GST の配列の一部を含んだアンチセンスプライマー GST-RS-SA3L<sup>Pro</sup> anti (配列番号 31) を用いて PCR を行った。この PCR 産物をフェノール/クロロホルム抽出し、制限酵素である XhoI (NEB 社製)、PstI (NEB 社製) によって切断した。また、GFP-RS-GUS プラスミドを同様に PstI (NEB 社製)、BamH 1 (NEB 社製) によって切断した。この 2 種の DNA を GENE CLEAN2 Kit (フナコシ社製) によって精製し、ライゲーションによってプラスミドを環状化し、Transformation し (1) と同様に目的のコロニーを選抜後、Small Scale し、このプラスミド |pEU-GST-RS-SA3CL<sup>Pro</sup> (配列番号 4)| を大腸菌内で増幅した。この後、プラスミドのみを得るために GenElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit (SIGMA 社製) を用いて精製した。この得られた GST-RS-SA3CL<sup>Pro</sup> ベクターを Spu プライマー、AODA2303 プライマーを用いて PCR を行った。

#### 【0048】

(5) コムギ胚芽抽出液の調製

北海道産チホコムギ種子及び/又は愛媛県産チクゴイズミコムギ種子を 1 分間に 100 g の割合でミル (Fritsch 社製: Rotor Speed Mill pulverisette14 型) に添加し、回転数 8,000 rpm で種子を温和に粉碎した。篩いで発芽能を有する胚芽を含む画分 (メッシュサイズ 0.7~1.00 mm) を回収した後、四塩化炭素とシクロヘキサンの混合液 (容量比=四塩化炭素:シクロヘキサン=2.4:1) を用いた浮選によって、発芽能を有する胚芽を含む浮上画分を回収し、室温乾燥によって有機溶媒を除去した後、室温送風によって混在する種皮等の不純物を除去して粗胚芽画分を得た。この粗胚芽画分から目視によってコムギ胚芽を判別し、タケ串を用いて選別した。

得られたコムギ胚芽画分を 4℃ の蒸留水に懸濁し、超音波洗浄機を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄した。次いで、ノニデット (Nonidet: ナカライ・テクトニクス社製) P40 の 0.5 容量% 溶液に懸濁し、超音波洗浄機を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄してコムギ胚芽を得た。

コムギ胚芽抽出物含有液の調製は常法 (Erickson, A.H. et al., (1996) Meth. In Enzymol., 96, 38-50) に準じた。以下の操作は 4℃ で行った。まず液体窒素で凍結したコムギ胚芽を乳鉢中で微粉碎した。得られた粉体 1g 当たり 1ml の Patterson らの方法を一部改変した抽出溶媒 (それぞれ) 最終濃度として、80 mM HEPES-KOH (pH 7.6)、200 mM 酢酸カリウム、2 mM 酢酸マグネシウム、4 mM 塩化カルシウム、各 0.6 mM L 型アミノ酸 20 種類、8 mM ジチオスレオトル) を加えて、泡が発生しないように注意しながら攪拌した。30,000×g、15 分間の遠心によって得られる上清を胚芽抽出液として回収し、

予め溶液（それぞれ）最終濃度として40 mM HEPES-KOH(pH 7.6)、100 mM酢酸カリウム、5 mM酢酸マグネシウム、各0.3 mMのL型アミノ酸20種類、4 mMジチオスレオールで平衡化したセファデックスG-25カラム（Amerham Pharmacia Biotech社製）でゲル濾過を行った。このようにして得られたコムギ胚芽抽出物含有液の濃度は、260 nmにおける光学密度 (O.D.) (A260) が170-250 (A260/A280=1.5) になるように調製した。

#### 【0049】

##### (6) 翻訳鑄型の作成

(1), (2), (3), (4) でクローニングしたPCR産物をそれぞれ転写鑄型とし, *in vitro* 転写を行った。転写は、それぞれ最終濃度として80 mM Hepes-KOH, 16 mM酢酸マグネシウム, 2 mMスペルミジン（ナカライ・テクトニクス社製）, 10 mM DTT, 3 mM NTP（和光純薬社製）, 1 U/ $\mu$ l SP6 RNA polymerase, 1 U/ $\mu$ l Rnase Inhibitor (TAKARA社製), 10% PCR産物となるように反応系25  $\mu$ lを調製した。この反応液を37℃で3時間インキュベートし、エタノール沈殿によりmRNA {SA3CL<sup>Pro</sup>, SA3CL<sup>Pro</sup> (C145A), GFP-RS-GUS, GFP-RS-SA3CL<sup>Pro</sup>, GST-RS-SA3CL<sup>Pro</sup>} を精製した。

#### 【0050】

(7) コムギ胚芽抽出液による無細胞タンパク質合成系（重層法）によるタンパク質合成  
重層法を用いてタンパク質 (GFP-RS-GUS, GFP-RS-SA3CL<sup>Pro</sup>, GST-RS-SA3CL<sup>Pro</sup>) の合成を行った。まず透析外液（それぞれ最終濃度で、30 mM HEPES-KOH (pH7.8)、100 mM酢酸カリウム、2.7 mM酢酸マグネシウム、0.4 mMスペルミジン（ナカライ・テクトニクス社製））、各0.25 mM L型アミノ酸20種類、2.5 mMジチオスレオール、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mM クレアチンリン酸（和光純薬社製））125  $\mu$ lをマイクロタイタープレートへ入れ、該溶液下に、上記（5）で調製されたコムギ胚芽抽出物含有液を最終的な光学密度 (O.D.) (A260) が60になるように加えたタンパク質合成用反応液（それぞれ最終濃度で、30 mM HEPES-KOH (pH7.8)、100 mM酢酸カリウム、2.7 mM酢酸マグネシウム、0.4 mMスペルミジン（ナカライ・テクトニクス社製））、各0.25 mM L型アミノ酸20種類、2.5 mMジチオスレオール、1.2 mM ATP、0.25 mM GTP、16 mMクレアチンリン酸（和光純薬社製）、400  $\mu$ g/ml クレアチンキナーゼ（Roche社製））25  $\mu$ lにて、上記（6）で調製したmRNA (GFP-RS-GUS, GFP-RS-SA3CL<sup>Pro</sup>, GST-RS-SA3CL<sup>Pro</sup>) を懸濁させ、タンパク質合成反応液の界面を乱さないように重層し、26℃で18時間インキュベートしタンパク質合成を行った。

#### 【0051】

(8) コムギ胚芽抽出液による無細胞タンパク質合成系（透析法）によるタンパク質合成  
透析法を用いてタンパク質 {SA3CL<sup>Pro</sup>, SA3CL<sup>Pro</sup> (C145A)} の合成を行った。透析カップMWCO 12000(Bio Tech社製)に（5）で用いたコムギ胚芽抽出物含有液、50  $\mu$ l, マルエム容器に透析外液700  $\mu$ lを入れ（コムギ胚芽抽出物含有液、透析外液共に最終濃度は（7）と同等である）タンパク質の基質、エネルギー源となるアミノ酸、ATPなどを供給しながら26℃で1日インキュベートしタンパク質合成を行った。

#### 【0052】

##### (9) SARS 3CL ProteaseによるRS配列の切断と活性検出

透析法（8）によって合成したSA3CL<sup>Pro</sup>, SA3CL<sup>Pro</sup> (C145A)、また、重層法（7）によって<sup>14</sup>C-LeuでラベルされたGFP-RS-GUS (<sup>14</sup>C-Leuの最終濃度は20  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) のタンパク質を等量混合し、37℃で2時間インキュベートした（図1A）。その後、この混合溶液にSample Buffer（それぞれ最終濃度で、50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2% ドデシル硫酸ナトリウム、1%  $\beta$ メルカプトエタノール、10% グリセロール、0.2% BPB（ナカライ・テクトニクス社製））を加え、98℃で5分間熱した後、氷水により急冷した。このサンプルに12.5% SDSゲルを用いて25 mAで80分間SDS-PAGEを行った。RI標識されたタンパク質はイメージングプレート及びBAS-2500（フジフイルム社製）により検出を行った（図1B）。

また、SA3CL<sup>Pro</sup>, GFP-RS-GUSを透析法でタンパク質合成した後、等量ずつ混合しNative

PAGEを行い、ダークリーダー（ビーエム機器株式会社製）で蛍光を検出した（図2）。

#### 【0053】

図1Bより、SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>は、GFPとGUS間のリンカーのcleavage site {RS (PPQTSITSAVLQ ↓ SGFRKMAFPSGKV) } 内で切断したが、mutantであるSA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup> (C145A)は切断しなかった。また、蛍光物質であるGFPは切断されると蛍光強度が飛躍的に上昇するという性質があることがわかった。

図2より、SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>の濃度を上昇させると、GFP-RS-GUSの切断された量を示すGFP蛍光強度が高まることを示した。

これは、SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>の活性は、GFP蛍光強度に比例するので、生理活性タンパク質の活性を阻害する候補薬剤の阻害効果を蛍光強度で測定できることがわかった。

#### 【0054】

(10) GST-RS-SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>, GFP-RS-SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>のSA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>によるオートリシス活性検出  
重層法(7)によって<sup>14</sup>C-LeuでラベルされたGFP-RS-SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>, GST-RS-SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup> (<sup>14</sup>C-Leuの最終濃度は12 μCi/μl)のこれらの合成液10 μlに3 x Sample Bufferを5 μl混合し(図3A, 図4A)、(9)で記載したようにRIで標識されたタンパク質の検出(図3B, 図4B)を行った。GST-RS-3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>の検出方法として、GST-RS-3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>は合成開始と共に、時間(分)ごとにサンプリングされ、SDS-PAGEで分離後、オートラジオグラフィーをした。また、GFP-RS-SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>の検出方法として、20時間反応後サンプリングされ、SDS-PAGEで分離し、オートラジオグラフィーをした(図4B)。

重層法によりGFP-RS-SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>、およびGFP-RS-SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup> (C145A)を合成し、Native PAGEを行い、ダークリーダー（ビーエム機器株式会社製）で蛍光を検出した（図5）。

#### 【0055】

図3Bより、SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>が自身のN末端に融合されたGSTとのリンカー部分にデザインされたcleavage site (RS) で自己切断が起きていることがわかった。さらに、GST-RS-SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>の合成開始から30分以内に、SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>がGSTとの間にあるRSを切断していることがわかる。これは、SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>が完全に成熟したタンパク質(foldingの終了)になる前の段階であるフォールディング過程においても、タンパク質の自己消化が起きていることがわかる。

図4Bより、SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>が自身のN末端に融合されたGFPとのリンカー部分デザインされたcleavage site (RS) で自己切断しているだけでなく、本来のcleavage site (RS) 以外で切断された産物も検出されていることがわかった(図中の矢印)。

図5より、SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>は、自身とGFP間のリンカーのcleavage site (RS) 内で切断したが、mutantであるSA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup> (C145A)は切断しなかった。これは、図1Bの結果と併せて、本発明によるコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞系では、SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>のような生理活性タンパク質をnativeかつ活性を維持したまま合成できるがわかった。また、図2と同様に切断されることによりGFP蛍光強度が高まるため、SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>の活性は、GFP蛍光強度に比例するので、生理活性タンパク質の活性を阻害する候補薬剤の阻害効果を蛍光強度で測定できることがわかった。

#### 【0056】

上記結果により、SA3CL<sup>P<sup>r</sup></sup>のプロテアーゼ活性のsensitivityがフォールディング過程とフォールディング終了後では異なることがわかった。すなわち、無細胞合成系でのタンパク質合成は、合成が開始されると、フォールディング途中のタンパク質も含まれており、フォールディングが不完全でもプロテアーゼとしての活性を持つが、本来のcleavage site以外の位置を切断していると考えられる。

すなわち、実際の細胞内(in vivo)では、不完全なフォールディング状態でも正常な切断部位と異なるプロテアーゼ活性を持つ生理活性タンパク質が存在していると考えられている。

#### 【0057】

従来のスクリーニング系では、主にフォールディング終了後の成熟タンパク質を対象としていた系であった。しかし、本発明に係るフォールディング過程のプロテアーゼに対す

る候補薬剤のスクリーニング系は、従来のスクリーニングでは対象としていなかった系であるので新規かつ有用と考えられる。

さらに、本発明に係るスクリーニング系では、従来の成熟したタンパク質だけでなく、翻訳過程のタンパク質、自己消化反応過程のタンパク質、基質認識反応過程のタンパク質、フォールディング反応過程のタンパク質の構造若しくは機能等についての反応性を候補薬剤としたスクリーニング手段も可能である。

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】 A: SARSプロテアーゼ (3CL<sup>Pro</sup>) がGFP-RS-GUS (基質) を切断する模式図 B: SA3CL<sup>Pro</sup> の活性を示すSDS-PAGE

【図2】 GFP-GUSの切断前後の蛍光強度の違いを示すNative PAGE

【図3】 A: SARSプロテアーゼ (3CL<sup>Pro</sup>) が自身のN末端に融合されたGSTとのつなぎ目にデザインされた切断サイトを自己切断する模式図 B: GST-3CL<sup>Pro</sup> の合成と共に切断される断片を示すオートラジオグラム。

【図4】 A: SARSプロテアーゼ (3CL<sup>Pro</sup>) が自身のN末端に融合されたGFPを切断する模式図 B: GFP-3CL<sup>Pro</sup> の合成と共に切断される断片を示すオートラジオグラム。

【図5】 自己分解活性阻害による蛍光強度の変化

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> ENDO, Yaeta  
 <110> SAWASAKI, Tatsuya

<120> A new high throughput screening method for a drug against biologically active protein

<130> NP03-1146

<160> 32

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
 <211> 4608  
 <212> DNA  
 <213> Human coronavirus

<400> 1  
 atttaggtga cactatagaa ctcacctatc tcccaacac ctaataacat tcaatcactc 60  
 ttccactaa ccacctatct acatcaccaa gatatacta gttctcgaga tgagcggctt 120  
 ccgcaagatg gccttcccca gcggcaaggt cgagggtgc atggtgcagg tcacctgcgg 180  
 caccactacc ctgaacggcc tgtggctgga tgacaccgtc tactgcccc gccacgtgat 240  
 ctgcaccgcc gaggacatgc tgaaccccaa ctacgaggac ctgctcatcc gcaagagcaa 300  
 ccactccttc ctggtgcagg ccggcaacgt ccagctgcgc gtgatcggcc acagcatgca 360  
 gaactgcctg ctccgcctga aggtggacac cagcaacccc aagaccccca agtacaagtt 420  
 cgtgcgcac cagcccggcc agaccttcag cgtgctggcc tgctacaacg gcagccccag 480  
 cggcgtgtac cagtgcgcca tgcgccccaa ccacaccatc aagggcagct tcctgaacgg 540  
 gagctgcggc agcgtgggct tcaacatcga ctacgactgc gtaagcttct gctacatgca 600  
 ccacatggag ctgcccaccg gcgtgcacgc cggcaccgac ctggagggca agttctacgg 660  
 ccccttcgtg gaccgccaga ccgccaggc cgccggcacc gacaccacca tcaccctgaa 720  
 cgtgctggcc tggctgtacg ccgccgtgat caacggcgac cgctggttcc tgaaccgctt 780  
 caccactacc ctgaacgact tcaacctggt ggccatgaag tacaactacg agcccctgac 840  
 ccaggaccac gtggacatcc tgggcccct gagcgcccag accggcatcg ccgtcctgga 900

catgtgcgcc gccctgaagg agctgctcca gaacggcatg aacggccgca ccatcctggg 960  
cagcaccatc ctggaggacg agttcacccc cttcgacgtc gtgcgccagt gcagcggcgt 1020  
gaccttccag taaggatcca tatatagggc ccgggttata attacctcag gtcgacgtcc 1080  
catggttttg tatagaattt acggctagcg ccggatgcga cgccggtcgc gtcttatccg 1140  
gccttcctat atcaggctgt gtttaagacg ccgccgcttc gcccaaatcc ttatgccggt 1200  
tcgacggctg gacaaaatac tgtttatctt cccagcgcag gcaggttaat gtaccacccc 1260  
agcagcagcc ggtatccagc gcgtatatac cttccggcgt acctttgcc tccagcgatg 1320  
cccagtgacc aaaggcgatg ctgtattctt cagcgacagg gccaggaatc gcaaaccacg 1380  
gtttcagtgg ggcaggggcc tcttccggcg attcttacta gctagtatgc ataggtgctg 1440  
aaatataaag tttgtgtttc taaaacacac gtggtacgta cgataacgta cagtgttttt 1500  
ccctccactt aaatcgaagg gtagtgtctt ggagcgcgcg gagtaaacad atatggttca 1560  
tatatgtccg taggcacgta aaaaaagcga gggattcgaa ttcccccgga acccccgggt 1620  
ggggcccacg cctcgatcga gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagctt 1680  
ggcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 1740  
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaataag tgagctaact 1800  
cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 1860  
gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcgggttt cgtattgggc gctcttccgc 1920  
ttcctcgtc actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 1980  
ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacadgtg 2040  
agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 2100  
taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 2160  
cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 2220  
tgttccgacc ctgccgtta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 2280  
gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct 2340  
gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 2400

tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 2460  
gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta 2520  
cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 2580  
aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt 2640  
tgtttgcaag cagcagatta cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 2700  
ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatgag 2760  
attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat 2820  
ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 2880  
tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat 2940  
aactacgata cgggaggggt taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc 3000  
acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 3060  
aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag 3120  
agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt 3180  
gggtgcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 3240  
agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 3300  
tgtcagaagt aagtggccg cagtgttatt actcatggtt atggcagcac tgcataattc 3360  
tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 3420  
attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa 3480  
taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg 3540  
aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctcgtgcacc 3600  
caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtagagcaa aaacaggaag 3660  
gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tggtgaatac tcataactctt 3720  
cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 3780  
tgaatgtatt tagaaaaata acaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc 3840  
acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaata ggcgatatcac 3900

gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct 3960  
cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg 4020  
cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat 4080  
tgtactgaga gtgcaccata tcgacgtctt cccttatgcg actcctgcat taggaagcag 4140  
cccagtagta ggttgaggcc gttgagcacc gccgccgcaa ggaatgggtg atgcaaggag 4200  
atggcgccca acagtcccc ggccacgggg cctgccacca taccacgcc gaaacaagcg 4260  
ctcatgagcc cgaagtggcg agcccgatct tccccatcgg tgatgtcggc gatataggcg 4320  
ccagcaaccg cacctgtggc gccggtgatg ccggccacga tgcgtccggc gtagaggatc 4380  
tggctagcga tgaccctgct gatttggttcg ctgaccatit ccgggggtgcg gaacggcggtt 4440  
accagaaact cagaaggttc gtccaaccaa accgactctg acggcagttt acgagagaga 4500  
tgatagggtc tgcttcagta agccagatgc tacacaatta ggcttgtaca tattgtcggtt 4560  
agaacgcggc tacaattaat acataacctt atgtatcata cacatacg 4608

<210> 2  
<211> 6389  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> pEU-GFP-GUS

<400> 2  
atttaggtga cactatagaa ctcacctatc tccccaacac ctaataacat tcaatcactc 60  
tttccactaa ccacctatct acatcaccaa gatatactc gagaatgggtg agcaagggcg 120  
aggagctggt caccgggggtg gtgcccattc tggtcgagct ggacggcgac gtgaacggcc 180  
acaagttcag cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga 240  
agttcatctg caccaccggc aagctgcccg tgccttgccc caccctcgtg accaccttca 300  
cctacggcgt gcagtgttc agccgtacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca 360  
agtccgcat gccgaaggc tacgtccagg agcgcccat cttcttcaag gacgacggca 420  
actacaagac ccgcgccgag gtgaagttcg agggcgacac cctgggtgaac cgcatcgagc 480



tgaaggcat cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact 540  
acaacagcca caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact 600  
tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga 660  
acacccccat cggcgacggc cccgtgctgc tgcccagaaa cactacctg agcaccagct 720  
ccgccctgag caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gatttcgtga 780  
ccgccgccgg gatcactcac ggcatggacg agctgtacaa gccccccag accagcatca 840  
cctctgccgt gctgcagagc ggcttccgca agatggcctt cccagcggc aaggtgatgt 900  
tacgtcctgt agaaaccca acccgtgaaa tcaaaaaact cgacggcctg tgggcattca 960  
gtctggatcg cgaaaactgt ggaattgatc agcgttggtg ggaaagcgcg ttacaagaaa 1020  
gccgggcaat tgctgtgcca ggcagtttta acgatcagtt cgccgatgca gatattcgta 1080  
attatgcggg caacgtctgg tatcagcgcg aagtctttat accgaaaggt tgggcaggcc 1140  
agcgtatcgt gctgcgtttc gatgcggtca ctattacgg caaagtgtgg gtcaataatc 1200  
aggaagtgat ggagcatcag ggcggtata cgccatttga agccgatgtc acgccgatg 1260  
ttattgccgg gaaaagtgtg cgtatcaccg tttgtgtgaa caacgaactg aactggcaga 1320  
ctatcccgcg gggaatgggtg attaccgacg aaaacggcaa gaaaaagcag tcttacttcc 1380  
atgatttctt taactatgcc ggaatccatc gcagcgtaat gctctacacc acgccgaaca 1440  
cctgggtgga cgatatcacc gtggtgacgc atgtcgcgca agactgtaac cacgcgtctg 1500  
ttgactggca ggtgggtggc aatgggtgatg tcagcgttga actgcgtgat gcggatcaac 1560  
aggtggttgc aactggacaa ggcactagcg ggactttgca agtgggtgaat ccgcacctct 1620  
ggcaaccggg tgaaggttat ctctatgaac tgtgcgtcac agccaaaagc cagacagagt 1680  
gtgatatcta cccgcttcgc gtcggcatcc ggtcagtggc agtgaagggc gaacagttcc 1740  
tgattaacca caaacgttc tactttactg gctttggctg tcatgaagat gcggacttgc 1800  
gtggcaaagg attcgataac gtgctgatgg tgcacgacca cgcattaatg gactggattg 1860  
gggccaactc ctaccgtacc tcgcattacc cttacgtga agagatgctc gactgggcag 1920  
atgaacatgg catcgtgggtg attgatgaaa ctgctgctgt cggctttaac ctctctttag 1980

gcattggttt cgaagcgggc aacaagccga aagaactgta cagcgaagag gcagtcaacg 2040  
gggaaactca gcaagcgcac ttacaggcga ttaaagagct gatagcgcgt gacaaaaacc 2100  
acccaagcgt ggtgatgtgg agtattgcc acaaccgga taccgtccg caaggtgcac 2160  
gggaatattt cgcgccactg gcggaagcaa cgcgtaaact cgacccgacg cgtccgatca 2220  
cctgcgtcaa tgtaatgttc tgcgacgctc acaccgatac catcagcgat ctctttgatg 2280  
tgctgtgcct gaaccgttat tacggatggg atgtccaaag cggcgatttg gaaacggcag 2340  
agaaggtact ggaaaaagaa cttctggcct ggcaggagaa actgcatcag ccgattatca 2400  
tcaccgaata cggcgtggat acgttagccg ggctgcactc aatgtacacc gacatgtgga 2460  
gtgaagagta tcagtgtgca tggctggata tgtatcaccg cgtctttgat cgcgtcagcg 2520  
ccgtcgtcgg tgaacaggta tggaatttcg ccgattttgc gacctcgcaa ggcatattgc 2580  
gcgttggcgg taacaagaaa gggatcttca ctgcgcaccg caaaccgaag tcggcggcctt 2640  
ttctgctgca aaaacgctgg actggcatga acttcgggtga aaaaccgcag caggaggagca 2700  
aacaatgaat caacaactct cctggcgcac catcgtcggc tacagcctcg ggaattgcta 2760  
ccgagctcgg tacctgtccg cggtcgcgac gtacgcgggc ggccgccata aattggatcc 2820  
atatataggg cccgggttat aattacctca ggtcgacgtc ccatggtttt gtatagaatt 2880  
tacggctagc gccggatgcg acgccggtcg cgtcttatcc ggccttccta tatcaggctg 2940  
tgtttaagac gccgccgctt cgcccaaata cttatgccgg ttcgacggct ggacaaaata 3000  
ctgtttatct tcccagcgca ggcagggtta tgtaccaccc cagcagcagc cggtatccag 3060  
cgcgtatata ccttccggcg tacctttgcc ctccagcgat gccagtgac caaaggcgat 3120  
gctgtattct tcagcgacag ggccaggaat cgcaaaccac ggtttcagtg gggcaggggc 3180  
ctcttccggc gattcttact agctagtatg cataggtgct gaaatataaa gtttgtgttt 3240  
ctaaaacaca cgtgggtacgt acgataacgt acagtgtttt tccctccact taaatcgaag 3300  
ggtagtgtct tggagcgcgc ggagtaaaca tataatgttc atatatgtcc gtaggcacgt 3360  
aaaaaaagcg agggattcga attcccccg aacccccggg tggggccac gcctcgatcg 3420  
agcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagct tggcgtaatc atggtcatag 3480

ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc 3540  
ataaagtgtg aagcctgggg tgcctaata ga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgctg 3600  
tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa 3660  
cgcgcgggga gaggcggtt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg 3720  
ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg 3780  
ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag 3840  
gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac 3900  
gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga 3960  
taccaggcgt tttcccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt 4020  
accgatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgcttttctca tagctcacgc 4080  
tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc 4140  
cccgttcagc ccgaccgctg cgcttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta 4200  
agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat 4260  
gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca 4320  
gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct 4380  
tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt 4440  
acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat ctttgatct tttctacggg gtctgacgct 4500  
cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc 4560  
acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaataca tctaaagtat atatgagtaa 4620  
acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta 4680  
tttcgttcac ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc 4740  
ttaccatctg gcccagtg gcgaatgata ccgcgagacc cacgctcacc ggctccagat 4800  
ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgtcc tgcaacttta 4860  
tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt 4920  
aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg ctcgtcgttt 4980

ggtatggcctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atcccccatg 5040  
ttgtgcaaaa aagcggtag ctcttcgggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc 5100  
gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc 5160  
gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagtac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg 5220  
cggcgaccga gttgctcttg cccggcgctca atacgggata ataccgcgcc acatagcaga 5280  
actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta 5340  
ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct 5400  
tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag 5460  
ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatctct tcctttttca atattattga 5520  
agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat 5580  
aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc 5640  
attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtctcgcg 5700  
cgtttcgggtg atgacgggtga aaacctctga cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct 5760  
tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtgttggc 5820  
gggtgtcggg gctggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag agtgcaccat 5880  
atcgacgctc tcccttatgc gactcctgca ttaggaagca gccagtagt aggttgaggc 5940  
cgttgagcac cgccgccgca aggaatgggt catgcaagga gatggcgccc aacagtcccc 6000  
cggccacggg gcctgccacc ataccacgc cgaaacaagc gctcatgagc ccgaagtggc 6060  
gagcccgatc ttccccatcg gtgatgtcgg cgatataggc gccagcaacc gcacctgtgg 6120  
cgccggtgat gccggccacg atgcgtccgg cgtagaggat ctggctagcg atgaccctgc 6180  
tgattgggtc gctgaccatt tccgggggtgc ggaacggcgt taccagaaac tcagaaggtt 6240  
cgtccaacca aaccgactct gacggcagtt tacgagagag atgatagggt ctgcttcagt 6300  
aagccagatg ctacacaatt aggcttgtac atattgtcgt tagaacgcgg ctacaattaa 6360  
tacataacct tatgtatcat acacatacg 6389

<210> 3  
<211> 4608  
<212> DNA  
<213> human coronavirus

<400> 3  
atttaggtga cactatagaa ctcacctatc tccccaacac ctaataacat tcaatcactc 60  
tttccactaa ccacctatct acatcaccaa gatatacta gttctcgaga tgagcggctt 120  
ccgcaagatg gccttcccca gcggcaaggt cgagggctgc atgggtgcagg tcacctgcgg 180  
caccactacc ctgaacggcc tgtggctgga tgacaccgtc tactgcccc gccacgtgat 240  
ctgcaccgcc gaggacatgc tgaaccccaa ctacgaggac ctgctcatcc gcaagagcaa 300  
ccactccttc ctgggtgcagg ccggcaacgt ccagctgcgc gtgatcggcc acagcatgca 360  
gaactgcctg ctccgcctga aggtggacac cagcaacccc aagaccccca agtacaagtt 420  
cgtgcgcatac cagcccggcc agaccttcag cgtgctggcc tgctacaacg gcagccccag 480  
cggcgtgtac cagtgcgcca tgcgccccaa ccacaccatc aagggcagct tcctgaacgg 540  
gagcgccggc agcgtgggct tcaacatcga ttacgactgc gtaagcttct gctacatgca 600  
ccacatggag ctgcccaccg gcgtgcacgc cggcaccgac ctggagggga agttctacgg 660  
ccccttcgtg gaccgccaga ccgcccaggc cgccggcacc gacaccacta tcacctgaa 720  
cgtgctggcc tggctgtacg ccgccgtgat caacggcgac cgctggttcc tgaaccgctt 780  
caccactacc ctgaacgact tcaacctggg ggccatgaag tacaactacg agcccctgac 840  
ccaggaccac gtggacatcc tgggccccct gagcgcccag accggcatcg ccgtcctgga 900  
catgtgcgcc gccctgaagg agctgctcca gaacggcatg aacggccgca ccacctggg 960  
cagcaccatc ctggaggacg agttcacccc cttcgacgtc gtgcgccagt gcagcggcgt 1020  
gaccttcag taaggatcca tatatagggc ccgggttata attacctcag gtcgacgtcc 1080  
catggttttg tatagaattt acggctagcg ccggatgcga cgccggctgc gtcttatccg 1140  
gccttcctat atcaggctgt gttaagacg ccgccgcttc gcccaaattc ttatgccggt 1200  
tcgacggctg gacaaaatac tgtttatctt ccagcgcag gcaggttaat gtaccacccc 1260  
agcagcagcc ggtatccagc gcgtatatac cticcggcgt acctttgccc tccagcgatg 1320

cccagtgacc aaaggcgatg ctgtattctt cagcgacagg gccaggaatc gcaaaccacg 1380  
gtttcagtgg ggcaggggcc tcttccggcg attcttacta gctagtatgc ataggtgctg 1440  
aaatataaag ttigtgtttc taaaacacac gtggtacgta cgataacgta cagtgttttt 1500  
ccctccactt aaatcgaagg gtagtgtctt ggagcgcgcg gagtaaacad atatggttca 1560  
tatatgtccg taggcacgta aaaaaagcga gggattcgaa ttcccccgga acccccgggt 1620  
ggggccacg cctcgatcga gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagctt 1680  
ggcgtaatca tggcatagc tgtttctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 1740  
caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag tgagctaact 1800  
cacattaatt gcgttgcgt cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 1860  
gcattaatga atcgccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc 1920  
ttctcgtc actgactcg tgcgctcgtt cggtcggctg cggcgagcgg tatcagctca 1980  
ctcaaaggcg gtaatacgtt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacadgtg 2040  
agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 2100  
taggtccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 2160  
cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 2220  
tgttccgacc ctgccgtta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 2280  
gcttttcat agctcacgt gtaggtatct cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct 2340  
gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgtgc gccttatccg gtaactatcg 2400  
tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 2460  
gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta 2520  
cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 2580  
aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt 2640  
tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 2700  
ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggcatgag 2760  
attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataat 2820

ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 2880  
tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac ccatagttgcc tgactccccg tcgtgtagat 2940  
aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc 3000  
acgtcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag 3060  
aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag 3120  
agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt 3180  
gggtgcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc gggtcccaac gatcaaggcg 3240  
agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcgggc ctccgatcgt 3300  
tgtcagaagt aagtggccg cagtgttata actcatgggt atggcagcac tgcataattc 3360  
tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 3420  
attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa 3480  
taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg 3540  
aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctctgcacc 3600  
caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtagagcaa aaacaggaag 3660  
gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 3720  
cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 3780  
tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg gggtccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc 3840  
acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac 3900  
gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcgggtga tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct 3960  
cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg 4020  
cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat 4080  
tgtactgaga gtgcaccata tcgacgtctt cccttatgcg actcctgcat taggaagcag 4140  
cccagtagta ggttgaggcc gttgagcacc gccgccgcaa ggaatgggtc atgcaaggag 4200  
atggcgccca acagtcccc ggccacgggg cctgccacca taccacgcc gaaacaagcg 4260  
ctcatgagcc cgaagtggcg agcccgatct tccccatcgg tgatgtcggc gatataggcg 4320

ccagcaaccg cacctgtggc gccggtgatg ccggccacga tgcgtccggc gtagaggatc 4380  
tggctagcga tgaccctgct gattggttcg ctgaccatit ccggggtgcg gaacggcggtt 4440  
accagaaact cagaagggtt gtccaaccaa accgactctg acggcagttt acgagagaga 4500  
tgatagggtc tgcttcagta agccagatgc tacacaatta ggcttgtaca tattgtcgtt 4560  
agaacgcggc tacaattaat acataacctt atgtatcata cacatacg 4608

<210> 4

<211> 5298

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pEU-GST-SARS-3CL

<400> 4

atttaggtga cactatagaa ctacactatc tccccaacac ctaataacat tcaatcactc 60  
tttcactaa ccacctatct acatcaccaa gatatcactc gagatggaat cccctatact 120  
aggttattgg aaaattaagg gccttgtgca acccactcga cttcttttgg aatatcttga 180  
agaaaaatat gaagagcatt tgtatgagcg cgatgaagggt gataaatggc gaaacaaaaa 240  
gtttgaattg ggtttggagt ttcccaatct tccttattat attgatgggtg atgttaaatt 300  
aacacagtct atggccatca tacgttatat agctgacaag cacaacatgt tgggtggttg 360  
tccaaaagag cgtgcagaga tttcaatgct tgaaggagcg gttttggata ttagatacgg 420  
tgtttcgaga attgcatata gtaaagactt tgaaactctc aaagttgatt ttcttagcaa 480  
gctacctgaa atgctgaaaa tggtcgaaga tcgtttatgt cataaaacat atttaaattgg 540  
tgatcatgta acccatcctg acttcatggt gtatgacgct cttgatgttg tttatacat 600  
ggaccaatg tgcctggatg cgttcccaa attagtttgt tttaaaaaac gtattgaagc 660  
tatcccacaa attgataagt acttgaaatc cagcaagtat atagcatggc ctttgcaggg 720  
ctggcaagcc acgtttgggtg gtggcgacca tcctccaaaa tcggaccacac cgagaccag 780  
catcacctct gccgtgctgc agagcggctt ccgcaagatg gccttcccca gcggcaagggt 840  
cgagggctgc atgggtgcagg tcacctgcgg caccactacc ctgaacggcc tgtggctgga 900



tgacaccgtc tactgcccc gccacgtgat ctgcaccgcc gaggacatgc tgaaccccaa 960  
ctacgaggac ctgctcatcc gcaagagcaa cactccttc ctggtgcagg ccggcaacgt 1020  
ccagctgcgc gtgatcgcc acagcatgca gaactgcctg ctccgcctga aggtggacac 1080  
cagcaacccc aagaccccca agtacaagtt cgtgcgcata cagcccggcc agaccttcag 1140  
cgtgctggcc tgctacaacg gcagccccag cggcgtgtac cagtgcgcca tgcgccccaa 1200  
ccacaccatc aagggcagct tcctgaacgg gagctgcggc agcgtgggct tcaacatcga 1260  
ctacgactgc gtaagcttct gctacatgca ccacatggag ctgcccaccg gcgtgcacgc 1320  
cggcaccgac ctggagggca agttctacgg ccccttcgtg gaccgccaga ccgcccaggc 1380  
cgccggcacc gacaccacta tcacctgaa cgtgctggcc tggctgtacg ccgccgtgat 1440  
caacggcgac cgctggttcc tgaaccgctt caccactacc ctgaacgact tcaacctggt 1500  
ggccatgaag tacaactacg agcccctgac ccaggaccac gtggacatcc tgggccccct 1560  
gagcgcaccag accggcatcg ccgtcctgga catgtgcgcc gccctgaagg agctgctcca 1620  
gaacggcatg aacggccgca ccacctggg cagcaccatc ctggaggacg agttcacccc 1680  
cttcgacgtc gtgcgccagt gcagcggcgt gaccttcag taaggatcca tatatagggc 1740  
ccgggttata attacctcag gtcgacgtcc catggttttg tatagaattt acggctagcg 1800  
ccggatgcga cgccggtcgc gtcttatccg gccttcctat atcaggctgt gttaagacg 1860  
ccgccgttc gcccaaatac ttatgccggt tcgacggctg gacaaaatac tgtttatctt 1920  
cccagcgcag gcaggttaat gtaccacccc agcagcagcc ggtatccagc gcgtatatac 1980  
cttcggcgt acctttgccc tccagcgatg ccagtgacc aaaggcgatg ctgtattctt 2040  
cagcgacagg gccaggaatc gcaaacacg gtttcagtgg ggcaggggcc tcttcggcg 2100  
attcttacta gctagtatgc ataggtgctg aaatataaag tttgtgtttc taaaacacac 2160  
gtggtacgta cgataacgta cagtgttttt ccctccactt aaatcgaagg gtagtgtctt 2220  
ggagcgcgcg gagtaaaca atatggttca tatatgtccg taggcacgta aaaaaagcga 2280  
gggattcgaa tcccccgga acccccggtt ggggcccacg cctcgatcga gcaaaaaaaa 2340  
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagctt ggcgtaatca tggcatagc tgtttcctgt 2400

gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa 2460  
agcctgggggt gcctaattgag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgccccgc 2520  
tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 2580  
aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt 2640  
cgttcggtg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 2700  
atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 2760  
taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia 2820  
aatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa ccgacagga ctataaagat accaggcggt 2880  
tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgtta ccgataacct 2940  
gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 3000  
cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 3060  
cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt 3120  
atgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc 3180  
tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat 3240  
ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 3300  
acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 3360  
aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga 3420  
aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 3480  
tttaaattaa aatgaagtt ttaaataaat cttaaagtata tatgagtaaa cttggtctga 3540  
cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac 3600  
catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 3660  
ccccagtgt gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 3720  
aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat 3780  
ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 3840  
caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 3900

attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa 3960  
agcggtttagc tccttcgggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttaggccc cagtgttatc 4020  
actcatgggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 4080  
ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 4140  
ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 4200  
gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 4260  
atccagttcg atgtaaccca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 4320  
cagcgtttct gggtagagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 4380  
gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa gcatttatca 4440  
gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 4500  
ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 4560  
gacattaacc tataaaaata ggcgatcac gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcgggtga 4620  
tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 4680  
ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg 4740  
ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tcgacgtct 4800  
cccttatgcg actcctgcat taggaagcag cccagtagta ggttgaggcc gttgagcacc 4860  
gccgccgcaa ggaatggtgc atgcaaggag atggcgccca acagtcccc ggccacgggg 4920  
cctgccacca taccacgcc gaaacaagcg ctcatgagcc cgaagtggcg agcccgatct 4980  
tccccatcgg tgatgtcggc gatataggcg ccagcaaccg cacctgtggc gccggtgatg 5040  
ccggccacga tgcgtccggc gtagaggatc tggctagcga tgaccctgct gattggttcg 5100  
ctgaccatth ccgggggtgcg gaacggcggt accagaaact cagaaggttc gtccaaccaa 5160  
accgactctg acggcagttt acgagagaga tgatagggtc tgcttcagta agccagatgc 5220  
tacacaatta ggcttgtaca tattgtcgtt agaacgcggc tacaattaat acataacctt 5280  
atgtatcata cacatacg 5298

<211> 5353  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> pEU-GFP-SARS-3CL

<400> 5  
atttaggtga cactatagaa ctcacctatc tccccaacac ctaataacat tcaatcactc 60  
tttccactaa ccacctatct acatcaccaa gatatcactc gagcatgggtg agcaagggcg 120  
aggagctgtt caccgggggtg gtgcccattc tggtcgagct ggacggcgac gtgaacggcc 180  
acaagttcag cgtgtccggc gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgaccctga 240  
agttcatctg caccaccggc aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accaccttca 300  
cctacggcgt gcagtgttc agccgtacc ccgaccacat gaagcagcac gacttttca 360  
agtccgcat gccgaaggc tacgtccagg agcgacccat ctcttcaag gacgacggca 420  
actacaagac ccgcccag gtgaagtctg agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc 480  
tgaagggcat cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact 540  
acaacagcca caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact 600  
tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga 660  
acacccccat cggcgacggc cccgtgctgc tgcccagaaa ccactacctg agcaccagct 720  
ccgccctgag caaagacccc aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga 780  
ccgccgccgg gatcactcac ggcatggacg agctgtacaa gccccccag accagcatca 840  
cctctgccgt gctgcagagc ggcttccgca agatggcctt cccagcggc aaggtcgagg 900  
gctgcatggt gcaggtcacc tgcggcacca ctaccctgaa cggcctgtgg ctggatgaca 960  
ccgtctactg cccccccac gtgatctgca ccgccgagga catgctgaac cccaactacg 1020  
aggacctgct catccgcaag agcaaccact cttcctggt gcaggccggc aacgtccagc 1080  
tgcgcgtgat cggccacagc atgcagaact gcctgctccg cctgaagggtg gacaccagca 1140  
acccaagac cccaagtac aagttcgtgc gcatccagcc cggccagacc ttcagcgtgc 1200  
tggcctgcta caacggcagc ccagcggcg tgtaccagtg cgccatgcgc cccaaccaca 1260

ccatcaaggg cagcttcctg aacgggagct gcggcagcgt gggcttcaac atcgactacg 1320  
actgcgtaag cttctgctac atgcaccaca tggagctgcc caccggcgtg cacgccggca 1380  
ccgacctgga gggcaagttc tacggcccct tcgtggaccg ccagaccgcc caggccgccg 1440  
gcaccgacac caccatcacc ctgaacgtgc tggcctggct gtacgccgcc gtgatcaacg 1500  
gcgaccgctg gttcctgaac cgcttcacca ctaccctgaa cgacttcaac ctggtggcca 1560  
tgaagtacaa ctacgagccc ctgaccagg accacgtgga catcctgggc cccctgagcg 1620  
cccagaccgg catcgccgtc ctggacatgt gcgccgccct gaaggagctg ctccagaacg 1680  
gcatgaacgg ccgcaccatc ctgggcagca ccaccttgga ggacgagttc acccccttcg 1740  
acgtcgtgcg ccagtgcagc ggcgtagcct tccagtaagg atccatatat agggcccggg 1800  
ttataattac ctcaggtcga cgtcccatgg ttttgtatag aatttacggc tagcgccgga 1860  
tgcgacgccg gtcggtctt atccggcctt cctatatcag gctgtgttta agacgccgcc 1920  
gcttcgcca aatccttatg ccggttcgac ggctggacaa aatactgttt atcttcccag 1980  
cgcaggcagg ttaatgtacc accccagcag cagccggtat ccagcgcgta tataccttcc 2040  
ggcgtacctt tgccctccag cgatgccag tgaccaaagg cgatgctgta ttcttcagcg 2100  
acagggccag gaatcgcaaa ccacggtttc agtggggcag gggcctcttc cggcgattct 2160  
tactagctag tatgcatagg tgctgaaata taaagtttgt gtttctaaaa cacacgtggt 2220  
acgtacgata acgtacagtg tttttccctc cacttaaate gaagggtagt gtcttggagc 2280  
gcgcggagta aacatatatg gttcatatat gtccgtaggc acgtaaaaaa agcgagggat 2340  
tcgaattccc ccggaacccc cggttggggc ccacgcctcg atcgagcaaa aaaaaaaaaa 2400  
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa 2460  
attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct 2520  
ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc 2580  
agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg 2640  
gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc 2700  
ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag 2760

gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa 2820  
aggccgcgtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc 2880  
gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc 2940  
ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg 3000  
cctttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt 3060  
cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccagacc 3120  
gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc 3180  
cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag 3240  
agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctgcg 3300  
ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa 3360  
ccaccgctgg tagcgggtgt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag 3420  
gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtggt aacgaaaact 3480  
cacgttaagg gatcttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa 3540  
attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt 3600  
accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag 3660  
ttgcctgact ccccgctcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca 3720  
gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc 3780  
agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt 3840  
ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg 3900  
ttgttgccat tgctacaggc atcgtgggtg cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca 3960  
gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg 4020  
ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagt ggccgcagtg ttatcactca 4080  
tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg 4140  
tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagt tatgcggcga ccgagttgct 4200  
cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca 4260

tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca 4320  
gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg 4380  
tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac 4440  
ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt 4500  
attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc 4560  
cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat 4620  
taacctataa aaataggcgt atcacgaggc ctttctgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg 4680  
gtgaaaacct ctgacacatg cagctcccgg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg 4740  
ccgggagcag acaagcccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc 4800  
ttaactatgc ggcatcagag cagattgtac tgagagtga ccatatcgac gctctccctt 4860  
atgcgactcc tgcattagga agcagcccag tagtaggttg aggccgttga gcaccgccgc 4920  
cgcaaggaat ggtgcatgca aggagatggc gccaacagt cccccggcca cggggcctgc 4980  
caccataccc acgccgaaac aagcgctcat gagcccgaag tggcgagccc gatcttcccc 5040  
atcgggtgatg tcggcgatat aggcgccagc aaccgcacct gtggcgccgg tgatgccggc 5100  
cacgatgcgt ccggcgtaga ggatctggct agcgatgacc ctgctgattg gttcgtgac 5160  
catttccggg gtgcggaacg gcgttaccag aaactcagaa ggttcgtcca accaaaccga 5220  
ctctgacggc agtttacgag agagatgata gggctctgctt cagtaagcca gatgctacac 5280  
aattaggctt gtacatattg tcgttagaac gcggctacaa ttaatacata accttatgta 5340  
tcatacacat acg 5353

<210> 6

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer for cloning SARS protease gene

<400> 6

cggcatgaac ggccgcacca tcctgggcag caccatcctg gaggacgagt tcaccccctt 60

cgacgtcgtg cgccagtgcg gggcggtgac cttccagtaa ggatccacta gttct 115

<210> 7  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer for cloning SARS protease gene

<400> 7  
ctgaaggagc tgctccagaa cgcatgaac ggccg 35

<210> 8  
<211> 115  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer for cloning SARS protease gene

<400> 8  
catgaagtac aactacgagc ccctgaccca ggaccacgtg gacatcctgg gccccctgag 60  
cgcccagacc ggcatcgccg tcctggacat gtgcgccgcc ctgaaggagc tgctc 115

<210> 9  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer for cloning SARS protease gene

<400> 9  
aacgacttca acctggtggc catgaagtac aacta 35

<210> 10  
<211> 115  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer for cloning SARS protease gene

<400> 10



cggcaccgac accaccatca ccctgaacgt gctggcctgg ctgtacgccg ccgtgatcaa 60

cggcgaccgc tggttcctga accgcttcac cactaccctg aacgacttca acctg 115

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer for cloning SARS protease gene

<400> 11

cgccagaccg cccaggccgc cggcaccgac accac 35

<210> 12

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer for cloning SARS protease gene

<400> 12

tgctacatgc accacatgga gctgcccacc ggcgatgcacg ccggcaccga cctggagggc 60

aagttctacg gcccttcgt ggaccgccag accgcccag 99

<210> 13

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer for cloning SARS protease gene

<400> 13

actacgactg cgtaagcttc tgctacatgc accac 35

<210> 14

<211> 115

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer for cloning SARS protease gene

<400> 14  
ccagccacag gccgttcagg gtagtggtgc cgcaggtgac ctgcaccatg cagccctcga 60  
ccttgccgct ggggaaggcc atcttgcgga agccgctcat ctcgaggggg ggccc 115

<210> 15  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer for cloning SARS protease gene

<400> 15  
ggggcagtag acggtgtcat ccagccacag gccgt 35

<210> 16  
<211> 115  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer for cloning SARS protease gene

<400> 16  
cgttgccggc ctgcaccagg aaggagtggg tgctcttgcg gatgagcagg tcctcgtagt 60  
tggggttcag catgtcctcg gcggtgcaga tcacgtggcg ggggcagtag acggt 115

<210> 17  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Primer for cloning SARS protease gene

<400> 17  
gccgatcacg cgcagctgga cggtgccggc ctgca 35

<210> 18  
<211> 115  
<212> DNA  
<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer for cloning SARS protease gene

&lt;400&gt; 18

tgaaggtctg gccgggctgg atgcgcacga acttgtactt gggggctctt ggggttgctgg 60

tgtccacctt caggcggagc aggcagttct gcatgctgtg gccgatcacg cgcag 115

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer for cloning SARS protease gene

&lt;400&gt; 19

gtttagcag gccagcacgc tgaaggtctg gccgg 35

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 115

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer for cloning SARS protease gene

&lt;400&gt; 20

cgatgttgaa gccacgctg ccgcagctcc cgttcaggaa gctgcccttg atggtgtggt 60

tggggcgcat ggcgactgg tacacgccgc tggggctgcc gtttagcag gccag 115

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed DNA based on protease originated from human coronavirus

&lt;400&gt; 21

gagaagctta cgcagtcgta gtcgatgttg aagccca 37

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Spu primer

<400> 22

gcgtagcatt taggtgacac t

21

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> AODA2303 primer

<400> 23

gtcagacccc gtagaaaaga

20

<210> 24

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> GFP-RS-GUS (E01-XhoI-A1)

<400> 24

gagactcgag tgatatcttg gtgatgtag

29

<210> 25

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> GFP-RS-GUS (GUS-RS-S1)

<400> 25

gagactgcag agcggcttcc gcaagatggc cttccccagc ggcaaggtga tggtacgtcc

60

tgtagaaac

69

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> GFP-RS-GUS (GFP-XhoI-S1)

<400> 26

gagactcgag aatggtgagc aagggcgagg

30

<210> 27

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> GFP-RS-GUS (GFP-RS-A1)

<400> 27

gagactgcag cacggcagag gtgatgctgg tctggggggg cttgtacagc tcgtccatg

59

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> GFP-RS-SA3CL pro (RS-3CL-S1)

<400> 28

gagactgcag agcggcttcc gcaagatggc

30

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> GFP-RS-SA3CL pro (M13)

<400> 29

gtaaaacgac ggccagt

17

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> GST-RS-SA3CL pro (GST-RS-sen)

<400> 30

gagactcgag atggaatccc cta

23

<210> 31

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> GST-RS-SA3CL pro (GST-RS-anti)

<400> 31

gagactgcag cacggcagag gtgatgctgg tctgcggtgg gtccgatttt ggaggatgg

59

<210> 32

<211> 306

<212> PRT

<213> SA3CL pro

<400> 32

Ser	Gly	Phe	Arg	Lys	Met	Ala	Phe	Pro	Ser	Gly	Lys	Val	Glu	Gly	Cys
1				5					10					15	

Met	Val	Gln	Val	Thr	Cys	Gly	Thr	Thr	Thr	Leu	Asn	Gly	Leu	Trp	Leu
			20					25					30		

Asp	Asp	Thr	Val	Tyr	Cys	Pro	Arg	His	Val	Ile	Cys	Thr	Ala	Glu	Asp
		35					40					45			

Met	Leu	Asn	Pro	Asn	Tyr	Glu	Asp	Leu	Leu	Ile	Arg	Lys	Ser	Asn	His
	50					55					60				

Ser	Phe	Leu	Val	Gln	Ala	Gly	Asn	Val	Gln	Leu	Arg	Val	Ile	Gly	His
65				70					75					80	

Ser	Met	Gln	Asn	Cys	Leu	Leu	Arg	Leu	Lys	Val	Asp	Thr	Ser	Asn	Pro
			85						90					95	

Lys Thr Pro Lys Tyr Lys Phe Val Arg Ile Gln Pro Gly Gln Thr Phe  
100 105 110

Ser Val Leu Ala Cys Tyr Asn Gly Ser Pro Ser Gly Val Tyr Gln Cys  
115 120 125

Ala Met Arg Pro Asn His Thr Ile Lys Gly Ser Phe Leu Asn Gly Ser  
130 135 140

Cys Gly Ser Val Gly Phe Asn Ile Asp Tyr Asp Cys Val Ser Phe Cys  
145 150 155 160

Tyr Met His His Met Glu Leu Pro Thr Gly Val His Ala Gly Thr Asp  
165 170 175

Leu Glu Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Phe Val Asp Arg Gln Thr Ala Gln  
180 185 190

Ala Ala Gly Thr Asp Thr Thr Ile Thr Leu Asn Val Leu Ala Trp Leu  
195 200 205

Tyr Ala Ala Val Ile Asn Gly Asp Arg Trp Phe Leu Asn Arg Phe Thr  
210 215 220

Thr Thr Leu Asn Asp Phe Asn Leu Val Ala Met Lys Tyr Asn Tyr Glu  
225 230 235 240

Pro Leu Thr Gln Asp His Val Asp Ile Leu Gly Pro Leu Ser Ala Gln  
245 250 255

Thr Gly Ile Ala Val Leu Asp Met Cys Ala Ala Leu Lys Glu Leu Leu  
260 265 270

Gln Asn Gly Met Asn Gly Arg Thr Ile Leu Gly Ser Thr Ile Leu Glu  
275 280 285

Asp Glu Phe Thr Pro Phe Asp Val Val Arg Gln Cys Ser Gly Val Thr  
290 295 300

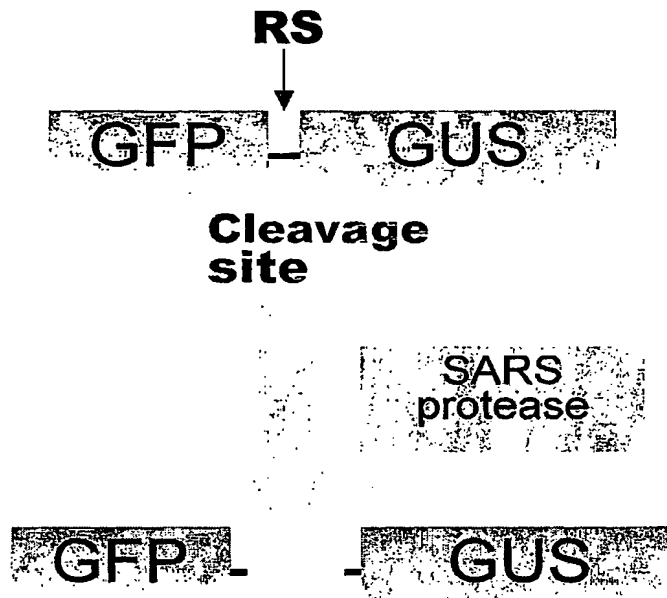
Phe Gln  
305



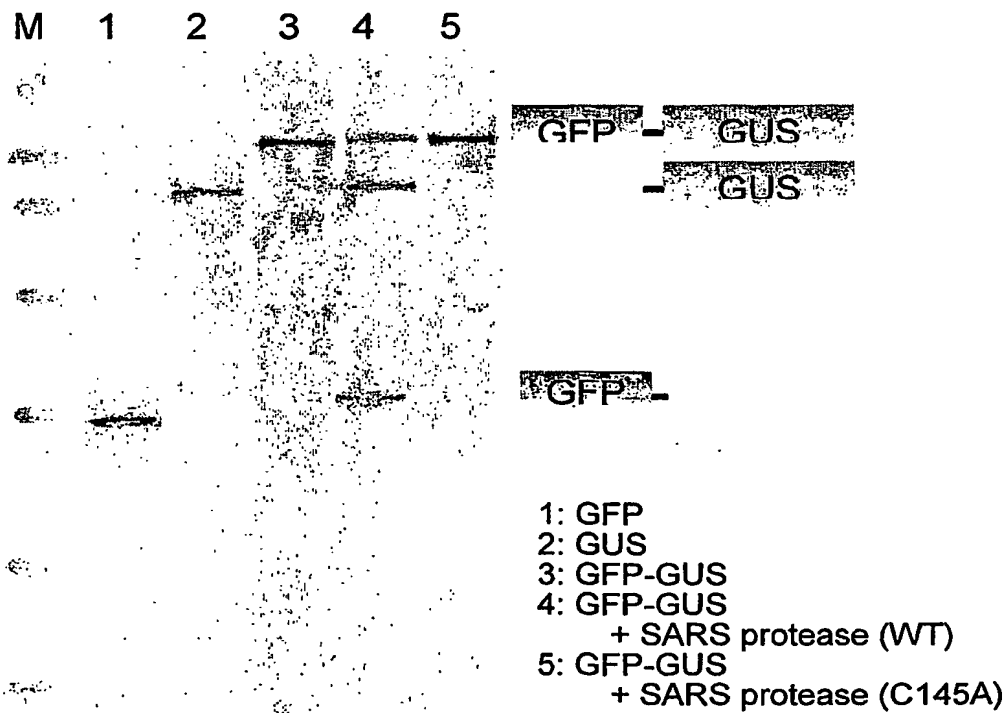
【書類名】 図面  
【図 1】

# 完全長 **SARS** プロテアーゼの活性測定

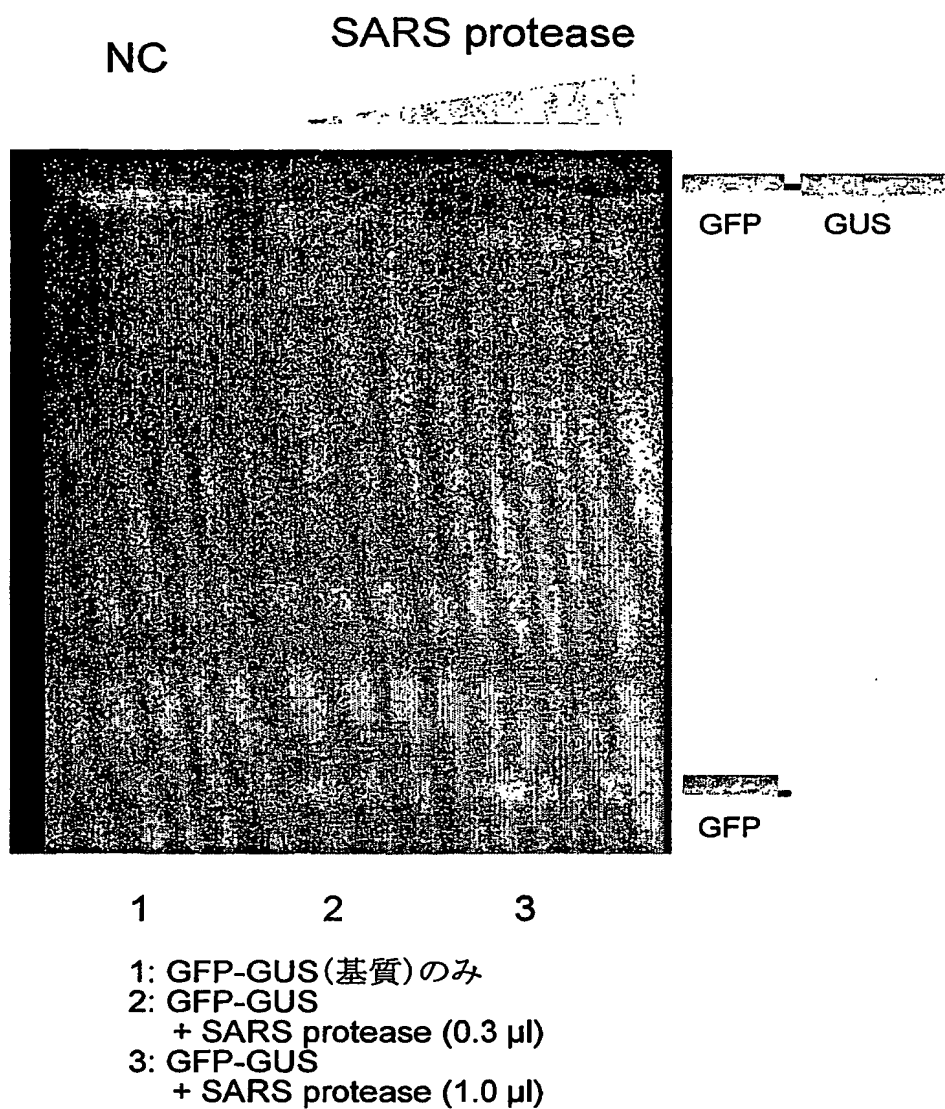
**A**



**B**



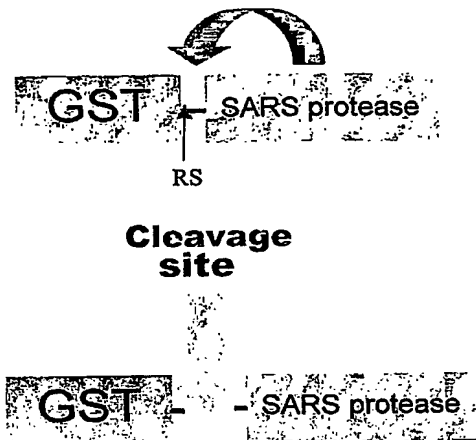
【図 2】



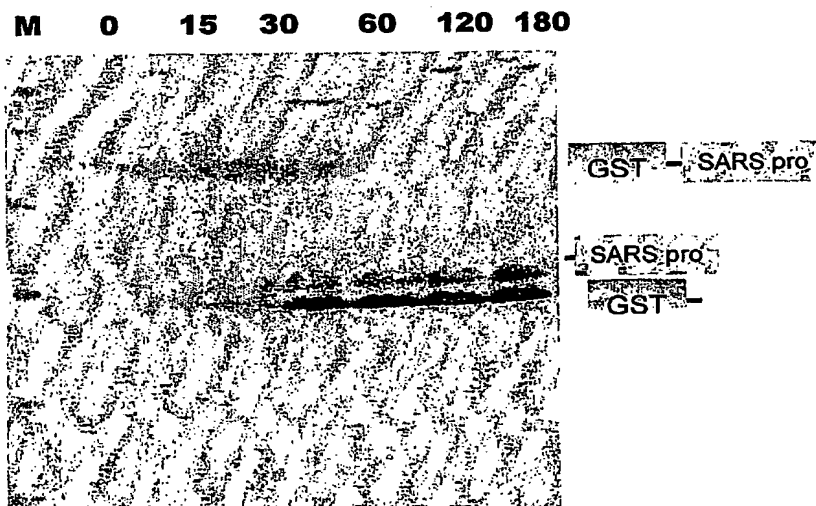
【図 3】

自己消化反応による **GST** 融合プロテアーゼの活性測定

**A**



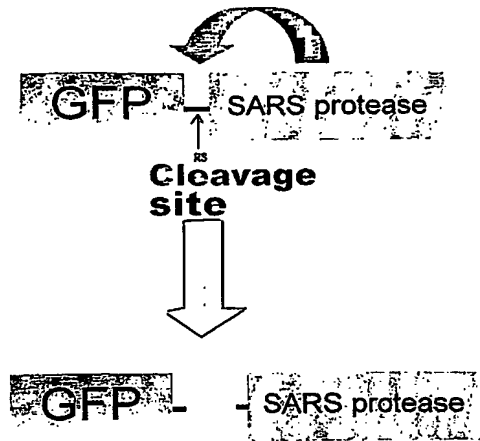
**B**



【図 4】

自己消化反応による **GFP** 融合プロテアーゼの活性測定

**A**



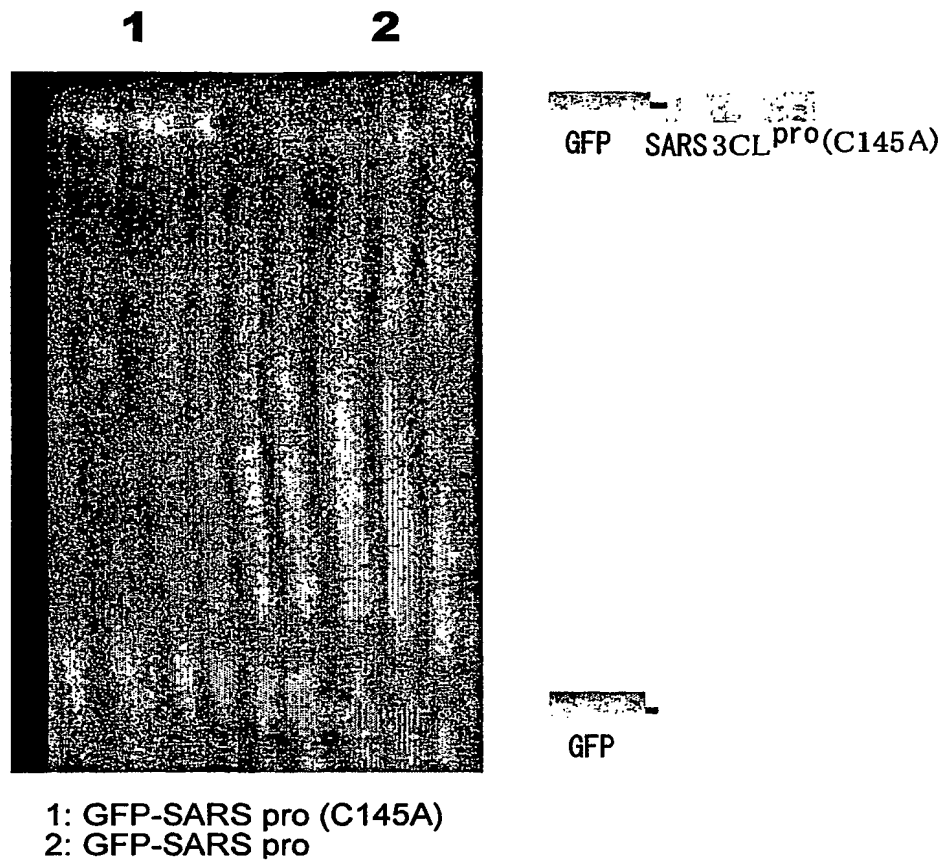
**B**

1 M



【図 5】

自己消化反応による蛍光強度の変化



**【書類名】要約書****【解決すべき課題】**

本発明は、コムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系を利用して、生理活性タンパク質に対する薬剤特に阻害剤の、安全にそして迅速なスクリーニング手段を提供することを課題とする。並びに従前にはない、co-translationalに生理活性タンパク質の活性を追うことが可能なコムギ胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系の利用により、細胞内の状況により近い反応系において、生理活性タンパク質の自己消化、基質認識、翻訳又はフォールディング過程の機能、構造等についての反応性を指標とする生理活性タンパク質に対する薬剤特に阻害剤のスクリーニング手段を提供することを課題とする。

**【課題を解決するための手段】**

本発明者らは、課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、無細胞タンパク質合成手段のうちコムギ胚芽を利用した系で、活性を維持した生理活性タンパク質の合成系を構築し、その合成系を利用する代表例としてSARS 3CL<sup>pro</sup>の阻害剤の候補物質のスクリーニング系を構築し本発明を完成した。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-316081
受付番号	50301487898
書類名	特許願
担当官	植田 晴穂 6992
作成日	平成15年 9月24日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 9月 8日
-------	-------------

【書類名】 出願人名義変更届  
【整理番号】 NP03-1146  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
    【出願番号】 特願2003-316081  
【承継人】  
    【識別番号】 503094117  
    【氏名又は名称】 株式会社セルフリースサイエンス  
【承継人代理人】  
    【識別番号】 100088904  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 庄司 隆  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100124453  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 資延 由利子  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 067070  
    【納付金額】 4,200円  
【提出物件の目録】  
    【包括委任状番号】 0317525



## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-316081
受付番号	50401517392
書類名	出願人名義変更届
担当官	鈴木 夏生 6890
作成日	平成17年 1月19日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】	平成16年 9月 7日
【承継人】	
【識別番号】	503094117
【住所又は居所】	神奈川県横浜市鶴見区小野町75番地1
【氏名又は名称】	株式会社セルフリースサイエンス
【承継人代理人】	申請人
【識別番号】	100088904
【住所又は居所】	東京都千代田区岩本町3丁目2番10号 SN岩 本町ビル6F
【氏名又は名称】	庄司 隆
【選任した代理人】	
【識別番号】	100124453
【住所又は居所】	大阪府大阪市淀川区西中島5-6-13-307 新大阪御幸ビル ユニード国際特許大阪事務所
【氏名又は名称】	資延 由利子

特願 2003-316081

出願人履歴情報

識別番号

[594016182]

1. 変更年月日

2000年 5月15日

[変更理由]

住所変更

住 所

愛媛県松山市久万ノ台478-17

氏 名

遠藤 弥重太

特願 2003-316081

ページ： 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[503056643]

1. 変更年月日

2003年 2月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

愛媛県松山市本町3-1-8-701

氏 名

澤崎 達也

特願 2 0 0 3 - 3 1 6 0 8 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 3 0 9 4 1 1 7 ]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 8 月 8 日

[変更理由]

住所変更

住 所

神奈川県横浜市鶴見区小野町 7 5 番地 1

氏 名

株式会社セルフリースサイエンス

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/013071

International filing date: 08 September 2004 (08.09.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-316081  
Filing date: 08 September 2003 (08.09.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 March 2005 (03.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse